

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 583**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2014 PCT/JP2014/054925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2014 E 14757745 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2963059**

54 Título: **Anticuerpo contra fibrina insoluble**

30 Prioridad:

28.02.2013 JP 2013039625

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

22.06.2018

73 Titular/es:

**NATIONAL CANCER CENTER (100.0%)
5-1-1, Tsukiji Chuo-ku
Tokyo 104-0045, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMURA, YASUHIRO;
YASUNAGA, MASAHIRO y
HISATA, YOHEI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 673 583 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra fibrina insoluble

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo que se une a fibrina insoluble; y un antígeno.

10 **Antecedentes de la Técnica**

Se ha desvelado que cuando un vaso sanguíneo se daña y la sangre está en contacto con la pared vascular dañada o el tejido subcutáneo en el vaso sanguíneo o el factor tisular fluye en la sangre, se inicia la reacción de coagulación sanguínea en la que el fibrinógeno en la sangre se convierte en fibrina insoluble, y una red de la fibrina funciona como un fuerte tapón hemostático y endurece la herida.

Desde el pasado se ha sugerido que la coagulación sanguínea está estrechamente relacionada con el cáncer (se describe en "Edema Caused by Thrombi in Limbs of Patient with Gastric Cancer" de un cirujano francés, Trousseau, en la década de 1800). Los datos epidemiológicos clínicos recientes han desvelado que la incidencia de trombosis debida a hipercoagulación es significativamente más elevada en pacientes con la mayoría de los tipos de cáncer que incluyen cáncer de páncreas, cáncer gástrico y tumores cerebrales que en personas sanas (NPL 1). Se cree que la acumulación de fibrina insoluble, la necrosis de la coagulación y la angiogénesis debida a la coagulación anómala se producen de forma repetida en tejidos cancerosos con la progresión del cáncer.

La fibrina insoluble no está presente en los tejidos en condiciones fisiológicas normales, a diferencia de su precursor, el fibrinógeno, que se encuentra ampliamente en un cuerpo vivo. El fibrinógeno se escinde mediante trombina que se ha filtrado desde el vaso sanguíneo y que se ha activado, y forma monómeros de fibrina. A continuación, los monómeros de fibrina se polimerizan y se reticular para formar fibra de fibrina. De esta manera, se forma fibrina insoluble. Por esta razón, la fibrina insoluble está presente de forma específica en tejidos en un estado patológico tal como hemorragia o inflamación, y se forma cuando se produce una afección patológica que implica coagulación, tal como cáncer, infarto de miocardio o infarto cerebral. Por consiguiente, la fibrina insoluble es una molécula marcadora de las enfermedades de ese tipo relacionadas con trombos, y se puede decir realmente que la fibrina insoluble presente en un tejido canceroso es una molécula específica del cáncer, especialmente en una situación en la que no está presente cualquier enfermedad cerebral o cardiovascular tal como infarto de miocardio o infarto cerebral. Como se ha descrito anteriormente, se ha mostrado que la fibrina insoluble está relacionada con la formación de trombos y enfermedades importantes, y por lo tanto existe una demanda de desarrollo de medios para detectar fibrina específicamente.

En vista de una situación de este tipo, se han desarrollado anticuerpos como medios para detectar fibrina (PTL 1 a 6). Además, los presentes inventores también han desarrollado un anticuerpo que se une a fibrina y que no se une a fibrinógeno, y aclara la utilidad del anticuerpo (PTL 7).

Sin embargo, dado que la fibrina insoluble se forma cuando las porciones terminales se escinden del precursor, fibrinógeno, las secuencias de aminoácidos de fibrina insoluble y fibrinógeno son completamente iguales excepto por la presencia o ausencia de las partes eliminadas por la escisión. Además, la fibrina soluble (los FDP, productos de degradación de la fibrina) formada por la degradación de la fibrina insoluble con plasmina o similares puede estar presente en un organismo vivo en algunos casos. Por consiguiente, la detección de fibrina insoluble en presencia de moléculas (fibrinógeno, los FDP, y similares) que tiene homologías extremadamente elevadas en términos de la secuencia de aminoácidos y la estructura requiere un anticuerpo que tenga una mayor afinidad y una mayor especificidad con respecto a la fibrina insoluble.

Listado de Citas**Bibliografía de Patentes**

- 55 [PTL 1] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2001-354700
 [PTL 2] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2009-149686
 [PTL 3] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2008-29353
 [PTL 4] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 9-127108
 60 [PTL 5] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 9-104700
 [PTL 6] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 8-301900
 [PTL 7] Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2012-72

Bibliografía de No Patente

- 65 [NPL 1] PD Stein *et al.*, "Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer", American J

Med., 2006, Vol. 116, pp. 60 a 68

Sumario de la Invención

5 Problema Técnico

La presente divulgación se ha realizado en vista de los problemas que se han descrito anteriormente de las tecnologías convencionales, y un objeto de la presente divulgación es proporcionar un anticuerpo que no se une al fibrinógeno y que tiene una alta afinidad y una alta especificidad hacia la fibrina insoluble.

10

Solución al Problema

Para resolver los problemas que se han descrito anteriormente, los presentes inventores han estudiado intensamente las propiedades y funciones del anticuerpo (anticuerpo 102-10) que se une a la fibrina y que no se une al fibrinógeno descrito en PTL 7. En consecuencia, se ha encontrado que el anticuerpo 102-10 permite la detección *in vitro* y *in vivo* de un trombo formado debido a cáncer, infarto cerebral, infarto de miocardio, una enfermedad inflamatoria, o similares. Además, también se ha encontrado que el anticuerpo 102-10 no se une al fibrinógeno, pero se puede unir a la cadena B β entre las tres cadenas polipeptídicas (cadena A α , cadena B β y cadena γ) que constituyen el fibrinógeno. Además, también se ha encontrado que el epítipo del anticuerpo 102-10 es un sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 en la cadena B β de fibrinógeno.

El fibrinógeno se convierte en un monómero de fibrina, por ejemplo, cuando el extremo amino terminal de la cadena B β de fibrinógeno que constituye el fibrinógeno se escinde, y se forma la cadena β de fibrinógeno. Además, el monómero se polimeriza o se reticula para formar fibrina insoluble. Los resultados de un análisis de simulación por ordenador realizado por los presentes inventores han desvelado que el epítipo en el fibrinógeno es un sitio que está presente en la cadena B β de fibrinógeno y que se une a la cadena γ de fibrinógeno. Basándose en los resultados, los presentes inventores han supuesto que el anticuerpo 102-10 no se puede unir al fibrinógeno, debido a que el epítipo del anticuerpo está oculto en la molécula. Además, los presentes inventores han supuesto que el anticuerpo 102-10 se puede unir a la fibrina insoluble, porque cuando el monómero de fibrina se polimeriza y se reticula, el epítipo en la cadena β de fibrinógeno o la cadena B β de fibrinógeno o se expone en el monómero de fibrina.

Sobre la base de una suposición de ese tipo, los anticuerpos monoclonales se prepararon de nuevo mediante inmunización de ratones usando, como un antígeno, cada uno del sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno y el sitio que se une a este sitio en la molécula de fibrinógeno y que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno. A continuación se evaluaron las afinidades de los anticuerpos obtenidos para fibrinógeno y fibrina insoluble. Cada uno de los anticuerpos no se unió al fibrinógeno y presentó una alta afinidad con respecto a la fibrina insoluble. Además, se ha encontrado que cada uno de los anticuerpos tiene una afinidad mucho más alta por la fibrina insoluble que el anticuerpo 102-10. Además, se determinaron las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad de cada uno de los anticuerpos preparados actualmente capaces de unirse al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno y los anticuerpos preparados en la actualidad capaces de unirse al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno. La presente divulgación se ha realizado basándose en los hallazgos que se han descrito anteriormente.

De forma específica, la presente invención proporciona un antígeno que consiste en las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 1 o 2.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a fibrina insoluble, que comprende la inmunización con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

También se desvelan los siguientes <1> a <11>.

<1> Un anticuerpo que se une a fibrina insoluble y que no se une a fibrinógeno, en el que el anticuerpo se une a un sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
<2> El anticuerpo de acuerdo con <1>, que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 4 a 6 o secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan; y
una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 8 a 10 o secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 8 a 10 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

<3> El anticuerpo de acuerdo con <1>, que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 12 a 14 o secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 12 a 14 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan; y

5 una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 16 a 18 o secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 16 a 18 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

<4> El anticuerpo de acuerdo con <1>, que comprende:

10 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan; y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

<5> El anticuerpo de acuerdo con <1>, que comprende:

20 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan;
y
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

<6> Un reactivo para medición inmunológica, que comprende el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5>.

30 <7> Un reactivo para diagnosticar una enfermedad relacionada con trombos, que comprende el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5>.

<8> Un agente para visualizar un trombo, que comprende el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5>.

<9> Un método para detectar fibrina insoluble en una muestra, que comprende las etapas de:

35 (a) poner el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5> en contacto con la muestra; y
(b) detectar si el anticuerpo se une o no a fibrina insoluble en la muestra.

<10> Un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con trombos en un sujeto, que comprende las etapas de:

40 (a) poner el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5> en contacto con una muestra obtenida a partir del sujeto, y
(b) detectar si el anticuerpo se une o no a fibrina insoluble en la muestra.

45 <11> Un conjugado, que comprende:

el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de <1> a <5>; y
una parte antitumoral.

50 Efectos Ventajosos

De acuerdo con la presente divulgación, es posible proporcionar un anticuerpo que no se une al fibrinógeno Y que tiene una alta afinidad y una alta especificidad con respecto a la fibrina insoluble. El uso de un anticuerpo de este tipo permite una detección elevada sensible, fiable y sencilla de la presencia de fibrina insoluble y un trombo y, a su vez, permite el diagnóstico de una enfermedad relacionada con trombos. Además, el uso de un anticuerpo de este tipo permite la administración de un compuesto o molécula adecuados a un sitio en el que está presente un trombo, por ejemplo, a un tumor.

60 Breve Descripción de las Figuras

[Fig. 1] La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de las afinidades de un anticuerpo (el anticuerpo 102-10 que se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2012-72) que se une a la fibrina y que no se une al fibrinógeno para fibrinas insolubles y fibrinógenos y que no se une al fibrinógeno para insolubles del ser humano y ratón con un método de ELISA.

65 [Fig. 2] La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de las afinidades del anticuerpo 102-10 para fibrina insoluble, productos obtenidos mediante la degradación de fibrina insoluble con

diversas enzimas (fibrinas solubles), y fibrinógeno con un método de ELISA.

[Fig. 3] La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de las afinidades del anticuerpo 102-10 y anticuerpos anti-fibrina disponibles en el mercado (NYB-T2G1 y MH-1) para fibrina insoluble humana, fibrinógeno humano, y dímero D (una fibrina soluble) con un método de ELISA. En el gráfico, cada "A" indica la afinidad hacia fibrina insoluble humana, cada "B" indica la afinidad hacia fibrinógeno humano, y cada "C" y cada "D" indica la afinidad hacia el dímero D.

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra microfotografías que muestran los resultados de inmunotinción de tejidos normales y tejidos cancerosos del cerebro, pulmón y páncreas con el anticuerpo 102-10.

[Fig. 5] La Fig. 5 muestra microfotografías que muestran los resultados de inmunotinción de tejidos de cáncer de colon, adenoma de colon, y linfadenitis reactiva con el anticuerpo 102-10.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra microfotografías que muestran los resultados de inmunotinción de tejidos con infarto cerebral (desde el inicio han transcurrido 3 semanas), infarto de miocardio (desde el inicio han transcurrido 3 semanas), pancreatitis aguda, y pancreatitis crónica con el anticuerpo 102-10.

[Fig. 7] La Fig. 7 muestra microfotografías que muestran los resultados de inmunotinción de tejidos con infarto cerebral, artritis, y lesión cutánea con el anticuerpo 102-10. Cada número de día en la figura representa el número de días transcurridos desde el inicio de la creación de la herida. Por otra parte, cada flecha indica un sitio en el que se forma fibrina insoluble (trombo).

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra un diagrama esquemático de una sonda de PET formada a partir del anticuerpo 102-10, p-isotiocianatobencil-desferrioxamina B, y núcleo de ^{89}Zr .

[Fig. 9] La Fig. 9 muestra fotografías que muestran los resultados obtenidos tomando imágenes de PET (tomografía de emisión de positrones) y CT (tomografía computarizada) de un ratón con cáncer inducido por vía química a que se le administró la sonda de PET que se muestra en la Fig. 8. En la figura, una fotografía del aspecto, imágenes de CT, imágenes de PET, e imágenes obtenidas por solapamiento de las imágenes de CT con las imágenes de PET del ratón con cáncer inducido por vía química se muestran en este orden desde la parte izquierda.

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra fotografías que muestran los resultados de la observación de una sección transversal de un tumor aislado a partir del ratón con cáncer inducido por vía química al que se le administró la sonda de PET que se muestra en la Fig. 8. En la figura, "HE" indica un resultado de observación de la sección transversal del tumor después de tinción con HE, "fibrina" indica un resultado de observación de la sección transversal del tumor después de inmunotinción con el anticuerpo 102-10, y "autorradiograma" indica un resultado obtenido mediante detección de radiación emitida desde la sonda de PET a la sección transversal del tumor.

[Fig. 11] La Fig. 11 es una microfotografía que muestra el resultado de inmunotinción de un coágulo de fibrina con el anticuerpo 102-10.

[Fig. 12] La Fig. 12 es una fotografía que muestra los resultados obtenidos mediante desarrollo de fibrinógeno en un estado reducido (la cadena A α de fibrinógeno, la cadena B β de fibrinógeno, y la cadena γ de fibrinógeno) y fibrinógeno en un estado no reducido por SDS-PAGE, y tinción de los geles sobre los que se desarrollaron estas proteínas con CBB. En la figura, "hu" y "ms" indican respectivamente que los fibrinógenos desarrollados se obtuvieron a partir de ser humano y ratón. Cada "Mw" indica una calle en la que se desarrollaron marcadores de peso molecular (lo mismo también se aplicará en la Fig. 13).

[Fig. 13] La Fig. 13 es una fotografía que muestra los resultados obtenidos mediante el desarrollo de fibrinógeno en un estado reduce (la cadena A α de fibrinógeno, la cadena B β de fibrinógeno, y la cadena γ de fibrinógeno) y fibrinógeno en un estado no reducido por SDS-PAGE seguido de un análisis mediante transferencia de Western usando el anticuerpo 102-10.

[Fig. 14] La Fig. 14 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena B β de fibrinógeno. La secuencia de aminoácidos marcada en el diagrama es la región (86 aminoácidos) que varía desde la histidina en la posición 179 a la lisina en la posición 264 de la cadena B β de fibrinógeno en la que la presencia del epítipo del anticuerpo 102-10 se sugiere mediante un análisis de secuenciación de aminoácidos.

[Fig. 15] La Fig. 15 es un gráfico que muestra los resultados del experimento de inhibición de unión competitiva con el anticuerpo 102-10 usando péptidos sintéticos que comprende secuencias parciales de la región formada por los 86 aminoácidos.

[Fig. 16] La Fig. 16 es un diagrama que muestra el resultado de un análisis de simulación por ordenador del estado de unión de la cadena B β de fibrinógeno y la cadena γ de fibrinógeno en la molécula de fibrinógeno. En el diagrama, la flecha indica el epítipo del anticuerpo 102-10 (el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno).

[Fig. 17] La Fig. 17 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de las afinidades del anticuerpo 102-10, anticuerpos anti-cadena β (anticuerpo Fib-0355 y anticuerpo Fib-3435), y anticuerpos anti-cadena γ (anticuerpo 13-30 y anticuerpo 34-105) para fibrina y fibrinógeno con el método de ELISA. Obsérvese que "Anticuerpos Anti-Cadena β " indica los resultados obtenidos mediante el análisis de anticuerpos monoclonales obtenido por inmunización de ratones con un polipéptido que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno and "Anticuerpos Anti-Cadena γ " indica los resultados obtenidos mediante el análisis de anticuerpos monoclonales obtenido por inmunización de ratones con un polipéptido que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno.

[Fig. 18] La Fig. 18 es un diagrama que muestran las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (cadena L), la región variable de cadena pesada (cadena H), y las CDR 1 a 3 de las mismas en un anticuerpo anti-cadena β (anticuerpo Fib-0355).

[Fig. 19] La Fig. 19 es un diagrama que muestran las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena

ligera (cadena L), la región variable de cadena pesada (cadena H), y las CDR 1 a 3 de las mismas en un anticuerpo anti-cadena γ (anticuerpo 34-105).

Descripción de Realizaciones

- 5 <Anticuerpo contra Fibrina Insoluble>
- 10 Como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación, los presentes inventores han mostrado que cada anticuerpo cuyo epítipo es el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno o el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 187 a 202 de la cadena β de fibrinógeno (ambos son el sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1) o el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno (el sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 2) se pueden unir a la fibrina insoluble pero no se pueden unir al fibrinógeno.
- 15 Por consiguiente, se desvela un anticuerpo que se une a la fibrina insoluble y que no se une al fibrinógeno, en el que el anticuerpo se une al sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o al sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
- 20 En la presente divulgación, la "fibrina insoluble" se refiere a una producida cuando un monómero de fibrina se produce a partir de fibrinógeno mediante la acción de trombina, y el monómero de fibrina se polimeriza para formar un polímero de fibrina apenas soluble, y el polímero de fibrina se reticulada con el factor XIII. Por otra parte, la "fibrina insoluble" en la presente divulgación incluye el polímero de fibrina y monómeros de fibrina que constituyen la fibrina insoluble, pero no incluyen materiales son movilizados producidos por degradación de fibrina insoluble mediante plasmina o similares (los FDP, productos de degradación de fibrina).
- 25 En la presente divulgación, el "fibrinógeno" se refiere un complejo en el que dos cadenas A α de fibrinógeno, dos cadenas B β de fibrinógeno, y dos cadenas γ de fibrinógeno se unen por puente. Cuando la "cadena B β de fibrinógeno" se origina a partir de ser humano, la "cadena B β de fibrinógeno" es habitualmente una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 19. Cuando la "cadena γ de fibrinógeno" se origina a partir de ser humano, la "cadena γ de fibrinógeno" es habitualmente una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 20. Por otra parte, la "cadena β de fibrinógeno" en la presente divulgación se refiere una proteína producida cuando la cadena B β de fibrinógeno se escinde mediante la acción de trombina, y fibrinopéptido B, que es la parte en el extremo N-terminal de la cadena B β de fibrinógeno, se retira. Cuando la "cadena β de fibrinógeno" se origina a partir de ser humano, la "cadena β de fibrinógeno" es habitualmente una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos en las posiciones 45 a 491 que se muestra en la SEQ ID NO: 19.
- 30 La secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno humana o la secuencia de aminoácidos en las posiciones 187 a 202 de la cadena β de fibrinógeno humana. La secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno humana.
- 35 Un "anticuerpo" en la presente divulgación incluye todas las clases y subclases de inmunoglobulinas. El significado de "anticuerpo" incluye un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal, y también incluye la forma de un fragmento funcional de un anticuerpo. Un "anticuerpo policlonal" es una preparación de anticuerpo que contiene diferentes anticuerpos contra diferentes epítopos. Por otra parte, un "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo (incluyendo un fragmento de anticuerpo) obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente uniforme. A diferencia de un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal reconoce un determinante individual en un antígeno. El anticuerpo de la presente divulgación es preferentemente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo separado y/o recuperado (es decir, aislado) de componentes en un entorno natural.
- 40 En la presente divulgación, si un anticuerpo se une a fibrina insoluble y si el anticuerpo no se une a fibrinógeno se puede determinar mediante un método conocido en el campo técnico. Un método de este tipo es, por ejemplo, un método de ELISA que usa una placa revestida con fibrina insoluble o fibrinógeno, tal como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación.
- 45 Además, en la presente divulgación, un anticuerpo que tiene una especificidad elevada hacia fibrina insoluble se refiere a un anticuerpo que se une a fibrina con una afinidad más elevada que las afinidades para otros péptidos y proteínas. En el presente documento, un medio de afinidad elevada tal como afinidad elevada con la que se puede detectar fibrina insoluble a la vez que se distingue de la fibrina insoluble de otras propiedades y proteínas con un método conocido en el campo técnico.
- 50 Además, el anticuerpo de la presente divulgación se puede unir a fibrinas insolubles de ser humano el ratón, pero no se une a fibrinógenos de ser humano y ratón, tal como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación.
- 55 Por consiguiente, los datos de ensayo obtenidos usando el anticuerpo en un ratón se pueden extrapolar al ser humano.

Además, los modos preferentes del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación incluyen un anticuerpo monoclonal (anticuerpo Fib-0355) producido por el hibridoma el Fib-0355, un anticuerpo monoclonal (anticuerpo Fib-3435) producido por el hibridoma Fib-3435, un anticuerpo monoclonal (anticuerpo 13-30) producido por el hibridoma 13-30, y un anticuerpo monoclonal (anticuerpo 34-105) producido por el hibridoma 34-105, que se muestran en los Ejemplos que se describen a continuación.

Por otra parte, otros modos preferentes del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación incluyen anticuerpos que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la cadena ligera CDR1 a CDR3 y una región variable de cadena pesada que comprende la cadena pesada CDR1 a CDR3 de uno de los anticuerpos monoclonales que se han descrito anteriormente producido por los hibridomas, y variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Los anticuerpos monoclonales preferentes de ese tipo incluyen un anticuerpo que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera CDR1 a CDR3 (las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NOs: 4 a 6) o secuencias de aminoácidos de la cadena ligera CDR1 a CDR3 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan, y

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada CDR1 a CDR3 (las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 8 a 10) o secuencias de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 a CDR3 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan, y

un anticuerpo que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera CDR1 a CDR3 (las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 12 a 14) o secuencias de aminoácidos de la cadena ligera CDR1 a CDR3 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan; y

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada CDR1 a CDR3 (las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 16 a 18) o secuencias de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 a CDR3 en al menos una de las cuales uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

Los anticuerpos monoclonales más preferentes de la presente divulgación incluyen

un anticuerpo que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan; y

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan, y

un anticuerpo que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan, y

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, presentan delección, se añaden, y/o se insertan.

Además, otros modos preferentes del anticuerpo de la presente divulgación son los anticuerpos, cada uno de los cuales presenta una afinidad hacia fibrina insoluble (una absorbancia a una longitud de onda de 492 nm) de 0,5 o más elevada (más preferentemente 1,0 o más elevada, además preferentemente 1,5 o más elevada, y de forma particularmente preferente 2,0 o más elevada) en el ensayo de ELISA que se muestra en el Ejemplo 2 que se describe a continuación.

Además, otros modos preferentes del anticuerpo de la presente divulgación son anticuerpos, cada uno de los cuales presenta una afinidad hacia fibrina insoluble (una absorbancia a una longitud de onda de 492 nm) que era 5 veces o más (más preferentemente 10 veces o más) más elevada que la del anticuerpo 102-10 que se describe en PTL 7, en el ensayo de ELISA que se muestra en el Ejemplo 2 que se describe a continuación.

Además, otros modos preferentes del anticuerpo de la presente divulgación son los anticuerpos, cada uno de los

cuales presentaba una proporción de modo que la afinidad hacia fibrina insoluble con respecto a la afinidad hacia fibrinógeno (la absorbancia a 492 nm) que la afinidad para fibrina insoluble es 10 veces o más elevada (más preferentemente 20 veces o más elevada) que la afinidad hacia el fibrinógeno en el ensayo de ELISA que se muestra en el Ejemplo 2 que se describe a continuación.

5 El anticuerpo de la presente divulgación incluye un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, y fragmentos funcionales de estos anticuerpos. En un caso en el que el anticuerpo de la presente divulgación se administra como un fármaco a un ser humano, el anticuerpo es de forma deseable un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano desde el punto de vista de la
10 reducción de efectos secundarios.

En la presente divulgación, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo en el que una región variable de un anticuerpo de una especie se une a una región constante de un anticuerpo de otra especie. Un anticuerpo quimérico Se puede obtener, por ejemplo, como sigue a continuación. De forma específica, un ratón se inmuniza con un
15 antígeno. Una porción que corresponde a una porción de anticuerpo variable (región variable) que se une al antígeno se recorta de un gen de un anticuerpo monoclonal del ratón, y esta porción se une a un gen de una porción constante (región constante) de un anticuerpo obtenido a partir de médula ósea de ser humano. Esto se incorpora en un vector de expresión, que a continuación se introduce en un hospedador para la producción de un anticuerpo quimérico. (Por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 8-280387, documento de Patente de
20 Estados Unidos N.º 4816397, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4816567, y documento de Patente de Estados Unidos N.º 5807715) Por otra parte, en la presente divulgación, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo obtenido mediante injerto (injerto de CDR) de una secuencia genética de un sitio de unión a antígeno (CDR) de un anticuerpo obtenido a partir de ser no humanos sobre un gen de un anticuerpo humano. Los métodos para preparar un anticuerpo humanizado se conocen (véanse, por ejemplo, los documentos EP239400, EP125023,
25 WO90/07861, y WO96/02576). En la presente divulgación, un "anticuerpo humano" es un anticuerpo en el que todas las regiones se obtienen a partir de un ser humano. En la preparación de un anticuerpo humano, es posible usar un método de identificación sistemática para la producción de un anticuerpo activo de linfocitos B humanos, un método de presentación de fagos, el uso de un animal transgénico (por ejemplo, un ratón) que hace que sea posible producir un repertorio de anticuerpos humanos cuando se inmuniza, y similares. Se conocen métodos para preparar un
30 anticuerpo humano (por ejemplo, Nature, 362: 255-258 (1993), Intern. Rev. Immunol, 13: 65-93 (1995), J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991), Nature Genetics, 15: 146-156 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727 (2000), Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 10-146194, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 10-155492, documento de Patente Japonesa N.º 2938569, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º Hei 11-206387, Publicación en Fase de Solicitud Internacional Japonesa N.º Hei 8-509612, y Publicación en
35 Fase de Solicitud Internacional Japonesa N.º Hei 11-505107).

En la presente divulgación, un "fragmento funcional" de un anticuerpo se refiere a una parte (fragmento parcial) de un anticuerpo que se une al sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o al sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, un fragmento de región variable (Fv), un Fv
40 estabilizado con disulfuro, un Fv de una sola cadena (scFv), un sc(Fv)₂, un diacuerpo, un anticuerpo poliespecífico, polímeros de los mismos, y similares.

En el presente documento, "Fab" se refiere a un fragmento de unión a antígeno monovalente a una inmunoglobulina, formado por una cadena ligera y una parte de una cadena pesada. El Fab se puede obtener
45 mediante digestión con papaína de un anticuerpo o con un método recombinante. El "Fab'" es diferente al Fab en que el número pequeño de restos, incluyendo uno o más restos de cisteína en la región bisagra del anticuerpo, se añaden al extremo carboxi terminal de un dominio CH1 de cadena pesada. "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de unión a antígeno divalente de una inmunoglobulina, formado por dos cadenas ligeras y partes de dos cadenas pesadas.
50

Un "fragmento de región variable (Fv)" es un fragmento de anticuerpo el más pequeño que tiene una reorganización de antígeno completa y sitios de unión. Un Fv es un dímero en el que una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera se unen fuertemente mediante un enlace no covalente. Un "Fv de una sola cadena (scFv)" incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, y
55 estas regiones existen en una cadena de polipéptido individual. Un "sc(Fv)₂" es una cadena individual obtenida por unión de dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera con un conector similar. Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño que tiene dos sitios de unión a antígeno. Este fragmento tiene una región variable de cadena pesada unida a una región variable de cadena ligera en una cadena de polipéptido individual, y cada región forma un par con una región complementaria de otra cadena. Un "anticuerpo poliespecífico" es un anticuerpo monoclonal que tienen especificidades de unión al menos con respecto a dos antígenos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo poliespecífico se puede preparar mediante coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina de los cuales las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades.
60

65 El anticuerpo de la presente divulgación incluye anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos se modifican sin reducir actividades indeseables (afinidad hacia un antígeno, especificidad con respecto a un antígeno, y/u otras

propiedades biológicas). Una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente divulgación se puede preparar mediante introducción de una mutación en un ADN que codifica la cadena de anticuerpo de la presente divulgación, o mediante síntesis peptídica. Los ejemplos de una modificación de ese tipo incluyen sustitución, delección, adición, y/o inserción de restos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente divulgación. Un sitio en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se modifica puede ser en una región constante de una cadena pesada o de una cadena ligera del anticuerpo, o en una región variable (región marco 5
10
15
20
25

El número de aminoácidos modificado es preferentemente 10 aminoácidos o inferior, más preferentemente 5 aminoácidos o inferior, y lo más preferentemente 3 aminoácidos o inferior (por ejemplo, 2 aminoácidos o inferior o 1 aminoácido). La modificación de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservativa. En la presente divulgación, la expresión "sustitución conservativa" se refiere a sustitución con un resto de aminoácido diferente que tiene una cadena lateral químicamente similar. Los grupos de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales de aminoácidos químicamente similares se conocen bien en el campo técnico al que pertenece la presente divulgación. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden agrupar en aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico), aminoácidos básicos (lisina, arginina, histidina), y aminoácidos neutros tales como los aminoácidos que tienen una cadena de hidrocarburo (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, y que prolina), aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (serina y treonina), aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina), aminoácidos que tienen un grupo amido (asparagina y glutamina), un aminoácido que tiene un grupo imino (prolina), y aminoácidos que tienen un grupo aromático (fenilalanina, tirosina y triptófano).

Además, la expresión "que tiene actividades equivalentes" se refiere a que la afinidad hacia un antígeno es equivalente a (por ejemplo, 70 % o superior a, preferentemente un 80 % o superior a, y más preferentemente un 90 % o superior) a las de un anticuerpo de referencia (por lo general con el anticuerpo Fib-0355, el anticuerpo Fib-3435, el anticuerpo 13-30, o el anticuerpo 34-105 que se muestran en los Ejemplos que se describen a continuación). La afinidad hacia un antígeno se puede evaluar con un método de ELISA como se ha descrito anteriormente.

Además, en la presente divulgación, con el fin de aumentar la estabilidad del anticuerpo o con otros fines, un aminoácido que experimenta desamidación o un aminoácido al lado de un aminoácido que experimenta desamidación se puede sustituir con un aminoácido diferente para suprimir la desamidación. Además, la estabilidad del anticuerpo también puede aumentar sustituyendo el ácido glutámico con un aminoácido diferente. También se desvela un anticuerpo que se estabiliza de ese modo.

Si el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo policlonal, el anticuerpo policlonal se puede obtener como sigue a continuación. De forma específica, un animal hospedador se inmuniza con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un antígeno (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2), un péptido parcial del mismo, células que expresan cualquiera de estos, o similares). A continuación, un antisuero del animal se purifica por medios convencionales (por ejemplo, desalinización, centrifugación, diálisis, cromatografía en columna, o similares). Por lo tanto, el anticuerpo policlonal se puede obtener. Por otra parte, un anticuerpo monoclonal se puede preparar mediante un método de hibridoma o un método de ADN recombinante.

El método de hibridoma por lo general es un método de Kohler y Milstein (Kohler & Milstein, Nature, 256: 495 (1975)). Las células que producen anticuerpos usadas en el proceso de fusión celular en este método son células de bazo, células de ganglio linfático, leucocitos de sangre periférica, o similares de un animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, mono o cabra) inmunizados con el antígeno. También es posible usar células que producen anticuerpos obtenidas por tratamiento de las células que se han descrito anteriormente, linfocitos o similares aislados de antemano a partir de un animal en un inmunizado con el antígeno en medio de cultivo. Como células de mieloma, se pueden usar diversas líneas de células conocidas. Las células que producen anticuerpos y las células de mieloma pueden ser las que se originan a partir de especies animales diferentes, siempre y cuando se puedan fusionar. Sin embargo, las células que producen anticuerpos y las células de mieloma se originan preferentemente a partir de la misma especie animal. Los hibridomas se pueden producir, por ejemplo, mediante fusión celular entre células de mieloma de ratón y células de bazo obtenidas a partir de un ratón inmunizado con el antígeno. Con la posterior identificación sistemática, se puede obtener un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal específico para el sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2. El anticuerpo monoclonal específico para el sitio que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2 se puede obtener mediante cultivo del hibridoma, o a partir de líquido ascítico de un mamífero al que se le administra el hibridoma.

El método de ADN recombinante es un método mediante el cual el anticuerpo de la presente divulgación se produce como un anticuerpo recombinante como sigue a continuación. Un ADN que codifica el anticuerpo de la presente

divulgación se clona a partir de un hibridoma, un linfocito B, o similares. El ADN clonado se incorpora en un vector adecuado, que a continuación se introduce en células hospedadoras (por ejemplo, una línea de células de mamífero, *E. coli*, células de levadura, células de insecto, células de plantas, o similares) para la producción del anticuerpo de la presente divulgación. (Por ejemplo, P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY, P. Shepherd y C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, Vandamme A. M. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 192: 767-775 (1990)). Para la expresión del ADN que codifica el anticuerpo de la presente divulgación, los ADN que codifican una cadena pesada y una cadena ligera se pueden incorporar por separado en vectores de expresión para transformar las células hospedadoras. Como alternativa, los ADN que codifican una cadena pesada y una cadena ligera se pueden incorporar en un solo vector de expresión para transformar las células hospedadoras (véase la Publicación Internacional N.º WO94/11523). El anticuerpo de la presente divulgación se puede obtener en una forma sustancialmente pura y homogénea mediante cultivo de las células hospedadoras, seguido de separación y purificación de las células hospedadoras o el líquido de cultivo. Para la separación y purificación del anticuerpo, se puede usar un método habitual usado para purificación de polipéptidos. Una vez que un animal transgénico (vacuno, cabra, oveja, cerdo, o similares) en el que se incorpora el gen de anticuerpo se prepara usando una técnica de producción de animal transgénico, también es posible para obtener una gran cantidad del anticuerpo monoclonal obtenido a partir del gen de anticuerpo en leche del animal transgénico.

Por consiguiente, la presente divulgación hace posible proporcionar un ADN que codifica el anticuerpo de la presente divulgación, un vector de expresión que comprende el ADN, un transformante que comprende el ADN o el vector de expresión y que produce el anticuerpo de la presente divulgación, un método para producir el anticuerpo de la presente divulgación, que comprende las etapas de: cultivar el transformante; y separar y purificar un anticuerpo en el transformante o un líquido de cultivo del mismo, y un hibridoma que produce el anticuerpo de la presente divulgación o que comprende un ADN que codifica el anticuerpo de la presente divulgación.

Además, la presente divulgación también hace posible proporcionar un método para producir un anticuerpo que se une a fibrina insoluble y que no se une a fibrinógeno, que comprende la inmunización con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Además, también es posible proporcionar un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2 para producir un anticuerpo que se une a fibrina insoluble y que no se une a fibrinógeno.

<Reactivo para medición inmunológica>

Como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación, la fibrina insoluble en una muestra se puede detectar usando el anticuerpo de la presente divulgación. La detección se puede realizar basándose en cualquier método de medición que usa un anticuerpo, es decir, cualquier método de medición inmunológica. Por ejemplo, la fibrina insoluble se puede detectar utilizando un método de tinción inmunohistoquímica y un método microscópico de inmunoelctrones o inmunoensayo (inmunoensayo enzimático (ELISA, EIA), fluoroinmunoensayo, radioinmunoensayo (RIA), inmunocromatografía, transferencia de Western, o similares).

La muestra a someter a ensayo no está limitada en particular, y los ejemplos de la misma incluyen muestras de tejido o células (tejidos o células de cáncer en el estómago, duodeno, intestino grueso, páncreas, vesícula biliar, conductos biliares, bronquios, pulmón, y similares), muestras de fluido biológico (mucosa gástrica, jugo duodenal, jugo pancreático, bilis, fluido ascítico, flema, fluido de lavado broncoalveolar, sangre, suero, plasma, y similares), y similares. Por ejemplo, para inmunotinción, como la muestra se usa preferentemente una muestra de tejido (una muestra de ensayo de biopsia o una muestra de ensayo extirpada) o una muestra de citología.

En el método de medición inmunológica de la presente divulgación, la fibrina insoluble se detecta permitiendo que la fibrina insoluble en una muestra se una al anticuerpo de la presente divulgación, y detectando la unión. En la presente divulgación, el término "detección" incluye no solamente la detección de la presencia o ausencia de fibrina insoluble, sino también la detección cuantitativa de fibrina insoluble e inmunotinción de fibrina insoluble.

El inmunoensayo de fibrina insoluble incluye por lo general la puesta de una muestra a someter a ensayo en contacto con el anticuerpo de la presente divulgación, y detectar el anticuerpo unido mediante un enfoque conocido en el campo técnico. El término "contacto" se refiere a que la fibrina insoluble presente en la muestra y en el anticuerpo de la presente divulgación se coloca en un estado en el que se pueden aproximar y unir entre sí. Los ejemplos del contacto incluyen operaciones tales como aplicación de una solución que contiene anticuerpo sobre una muestra sólida, inmersión de una muestra sólida en una solución que contiene anticuerpo, y mezcla de una muestra líquida con una solución que contiene anticuerpos.

El inmunoensayo se puede realizar en un sistema en fase líquida o un sistema en fase sólida. Además, el modo del inmunoensayo no está limitado, y puede ser un método en fase sólida directo, así como un método de sándwich, un método competitivo, o similares.

El anticuerpo de la presente divulgación también se puede usar histológicamente para detección *in situ* de fibrina insoluble al igual que en un método de tinción inmunohistoquímica (por ejemplo, un método de inmunotinción) o un

método microscópico de inmunoelectrones. La detección *in situ* se puede realizar mediante, por ejemplo, el corte de una muestra histológica de un sujeto (una muestra de tejido de biopsia, una sección de tejido embebida en parafina, o similares), y poniendo un anticuerpo etiquetado en contacto con la muestra histológica.

5 Con respecto a las operaciones del ensayo, el inmunoensayo se puede realizar con un método conocido (Ausubel, F. M. *et al.* (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 11 "immunology, ", John Wiley & Sons, Inc. 1995). Como alternativa, un conjugado de fibrina insoluble y el anticuerpo se prevén separar con una técnica de separación conocida (un método de cromatografía, un método de desalinización, un método de precipitación en alcohol, un método enzimático, un método en fase sólida como similares), y la señal de la etiqueta se puede detectar.

10 Cuando, por ejemplo, un sistema de fase sólida se usa para el inmunoensayo, el anticuerpo se puede inmovilizar sobre un soporte o vehículo en fase sólida (placa de resina, membrana, perlas o similares), o la muestra se puede inmovilizar. Por ejemplo, el anticuerpo se inmoviliza en un soporte en fase sólida, y el soporte se lava con un tampón adecuado, seguido de tratamiento con una muestra. A continuación, el soporte en fase sólida se somete Al segundo lavado usando el tampón para retirar el anticuerpo no unido. A continuación, el anticuerpo unidos sobre el soporte sólido se puede detectar mediante una técnica convencional para detectar la unión entre fibrina insoluble en la muestra y el anticuerpo. Como alternativa, después de tratar una muestra sólida con una solución que contiene el anticuerpo, y a continuación el anticuerpo unido se retira mediante lavado con un tampón, el anticuerpo unidos sobre la muestra sólida se puede detectar mediante una técnica convencional.

20 La actividad de unión de un anticuerpo se puede medir con un método bien conocido. Las personas con experiencia en la materia pueden determinar un método de medición eficaz y óptimo para cada ensayo dependiendo del tipo y modo del inmunoensayo a usar, el tipo de la etiqueta a usar, el objeto a etiquetar, y similares.

25 Para facilitar la detección de la reacción entre el anticuerpo de la presente divulgación y la fibrina insoluble presente en la muestra, el anticuerpo de la presente divulgación se etiqueta para detectar directamente la reacción, o Un anticuerpo secundario etiquetado, un complejo de biotina-avidina, o similar se usa para detectar indirectamente la reacción. Los ejemplos de etiquetas que se pueden usar en la presente divulgación y métodos de detección de las mismas se describen a continuación.

30 Para el inmunoensayo enzimático, por ejemplo, se puede usar peroxidasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, acetilcolinesterasa, lactato deshidrogenasa, amilasa, o similares. También se puede usar una sustancia de inhibición enzimática, una coenzima, o similares. Cada una de las enzimas se puede conjugar con el anticuerpo mediante un método conocido usando un agente de reticulación tal como glutaraldehído o un compuesto de maleimida.

35 Para fluoroinmunoensayo, por ejemplo, se puede usar isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), o similares. Estas etiquetas fluorescentes se pueden conjugar con el anticuerpo mediante una técnica convencional.

40 Para radioinmunoensayo, por ejemplo, se puede usar tritio, yodo 125, yodo 131, o similares. La etiqueta radiactiva se puede conjugar con el anticuerpo mediante un método conocido tal como el método de cloramina T O el método de Bolton y Hunter.

45 Por ejemplo, cuando el anticuerpo de la presente divulgación se etiqueta directamente con una etiqueta como se ha descrito anteriormente, un complejo de fibrina insoluble y el anticuerpo se forma poniendo una muestra en contacto con el anticuerpo etiquetado de la presente divulgación. Para cuantificación, después de separar el anticuerpo etiquetado no unido, la cantidad de fibrina insoluble en la muestra se puede determinar basándose en la cantidad del anticuerpo etiquetado unido o en la cantidad del anticuerpo etiquetado no unido.

50 Como alternativa, cuando se usa, por ejemplo, un anticuerpo secundario etiquetado, el anticuerpo de la presente divulgación y la muestra se hacen reaccionar entre sí (reacción primaria), y el complejo obtenido se hace reaccionar adicionalmente con el anticuerpo secundario etiquetado (reacción secundaria). La reacción primaria y la reacción secundaria se pueden realizar en orden inverso, o se pueden realizar de forma simultánea o después de un intervalo de tiempo. La reacción primaria y la reacción secundaria dan como resultado la formación de un complejo de fibrina-el anticuerpo de la presente divulgación-el anticuerpo secundario etiquetado o un complejo del anticuerpo de la presente divulgación-fibrina-el anticuerpo secundario etiquetado. Además, cuando se realiza cuantificación, el anticuerpo secundario etiquetado no unido se separa, y a continuación la cantidad de fibrina insoluble en la muestra se puede determinar basándose en la cantidad del anticuerpo secundario etiquetado unido o en la cantidad del anticuerpo secundario etiquetado no unido.

60 Cuando se usa el complejo de biotina-avidina, un anticuerpo biotilado y la muestra se hacen reaccionar, y a continuación el complejo tenido se hace reaccionar con la avidina etiquetada. Dado que la avidina se puede reunir de forma específica a la biotina, la unión entre el anticuerpo y la fibrina insoluble se puede determinar mediante la detección de la señal de la etiqueta unida a la avidina. La etiqueta unida a la avidina no está limitada en particular, y es preferentemente, por ejemplo, una etiqueta enzimática (peroxidasa, fosfatasa alcalina como similares).

65

La señal de la etiqueta también se puede detectar mediante un método conocido en el campo técnico. Por ejemplo, cuando se usa una etiqueta enzimática, un sustrato que se degrada mediante una acción enzimática para desarrollar un color se añade, la cantidad del sustrato degradado se mide por vía óptica para determinar la actividad enzimática, y esta actividad enzimática se convierte en la cantidad del anticuerpo unido, y la cantidad del anticuerpo se calcula mediante comparación con un valor patrón. El sustrato varía dependiendo del tipo de la enzima usada. Por ejemplo, cuando se usa peroxidasa como la enzima, se puede usar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), diaminobencidina (DAB), o similares. Por otra parte, cuando se usa fosfatasa alcalina como la enzima, se puede usar para-nitrofenol o similares. La etiqueta fluorescente se puede detectar y cuantificar usando, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, un lector de placas, o similares. Cuando se usa la etiqueta radiactiva, la cantidad de radiación emitida por la etiqueta radiactiva se mide con un contador de centelleo o similar.

La presente divulgación también se refiere a un reactivo para medición inmunológica de fibrina insoluble, que comprende el anticuerpo de la presente divulgación. En el reactivo para medición inmunológica de la presente divulgación, el anticuerpo se puede etiquetar. Además, el anticuerpo se puede presentar en una forma libre, o se puede inmovilizar sobre un soporte de fase sólida (por ejemplo, una membrana, perlas o similares).

Además del anticuerpo de la presente divulgación, el reactivo para medición inmunológica puede comprender componentes útiles para realizar un método de medición inmunológica. Los ejemplos de los componentes de ese tipo incluyen un tampón, un reactivo de tratamiento de muestra, una etiqueta, un competidor, un anticuerpo secundario, y similares para su uso en el inmunoensayo. El uso del reactivo para medición inmunológica de la presente divulgación permiten la detección fácil y sencilla de la fibrina insoluble en la muestra.

<Reactivo para Diagnóstico de Enfermedad Relacionada con Trombo>

Dado que el anticuerpo de la presente divulgación reacciona de forma específica con la fibrina insoluble humana como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación, el anticuerpo de la presente divulgación se puede usar como un reactivo para diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la fibrina, por ejemplo, una enfermedad relacionada con trombo. En la presente divulgación, una "enfermedad relacionada con trombo" se refiere a una enfermedad o trastorno cuya afección se relaciona con la presencia de un trombo. Las enfermedades relacionadas con trombos de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, infarto, por ejemplo, infarto de miocardio, infarto cerebral, hemorragia cerebral, embolia cerebral, trombosis cerebral, hemorragia subaracnoidea, infarto pulmonar, y similares, y cáncer, por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de ovarios, cáncer de mama, y cáncer de pulmón. Mediante la detección de la presencia de fibrina insoluble, es posible diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad relacionada con trombos, diagnosticar la evolución (agravamiento o mejoría) de una enfermedad relacionada con trombos, y especificar la posición de una enfermedad relacionada con trombos.

El reactivo para diagnóstico de la presente divulgación comprende el anticuerpo que se ha descrito anteriormente de la presente divulgación. Por consiguiente, la detección de la fibrina insoluble contenida en una muestra tomada de un sujeto con una enfermedad relacionada con trombos (por ejemplo, infarto o cáncer) o con una enfermedad de la que se sospecha que está relacionada con trombos mediante el uso del reactivo para diagnóstico de la presente divulgación hace posible diagnosticar de forma rápida y sencilla la presencia de una enfermedad relacionada con trombos en el sujeto, la evolución de la enfermedad relacionada con trombos en el sujeto, y la posición de la enfermedad relacionada con trombos en el sujeto. También se conocen bien un reactivo para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno que usar un método de medición inmunológica de ese tipo, cualquiera de los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente los componentes adecuados que no son el anticuerpo. Además, el reactivo para diagnóstico de la presente divulgación se puede usar para cualquier procedimiento, siempre y cuando el procedimiento esté destinado a la realización de un método de medición inmunológica.

<Visualización/Formación de Imágenes *In Vivo* de Trombos, Administración al Sitio del Trombo>

Quando se administra a un sujeto, el anticuerpo de la presente divulgación se une a la fibrina insoluble en el sujeto. Por consiguiente, el uso del anticuerpo de la presente divulgación hace posible visualizar la fibrina insoluble, es decir, un trombo en un sujeto. Además, mediante la conjugación de un compuesto o molécula con el anticuerpo de la presente divulgación, es posible administrar el compuesto o molécula a la fibrina insoluble, es decir, un sitio con trombo en el sujeto.

El agente para visualizar un trombo de la presente divulgación comprende preferentemente un anticuerpo etiquetado de la presente divulgación. Como la etiqueta, se puede usar cualquier etiqueta conocida en el campo de formación de imágenes *in vivo*. Las etiquetas de este tipo incluyen sustancias fluorescentes, por ejemplo, la serie IRDye800, fluoresceína, FITC, metales fluorescentes (¹⁵²Eu, serie de los lantánidos, y similares), y similares; sustancias quimioluminiscentes o bioluminiscentes, por ejemplo, luminol, imidazol, luciferina, luciferasa, proteína fluorescente de color verde (GFP), y similares; radioisótopos, por ejemplo, ⁸⁹Zr, ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹³¹I, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Cu, ¹¹C, ¹³N, y similares; isótopos paramagnéticos, por ejemplo, ¹⁵³Gd, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr, ⁵⁶Fe, y similares; y agentes de contraste, por ejemplo, gadolinio, complejos de gadolinio, agentes de contraste de yodo, y similares. El anticuerpo y la etiqueta se pueden conjugar entre sí mediante un método conocido en el campo técnico. Por ejemplo, el anticuerpo y la etiqueta

se pueden conjugar por vía química directamente entre sí. Como alternativa, el anticuerpo y la etiqueta se pueden conjugar de forma indirecta entre sí a través de un conector adecuado. Los ejemplos del conector incluyen p-isotiocianatobencil-desferrioxamina B, tiocarbamato, amida, carbamato, y maleimida.

5 Además, en la presente divulgación, mediante la conjugación del anticuerpo de la presente divulgación con un compuesto o una molécula tal como un fármaco o un profármaco en lugar de la etiqueta con el compuesto o molécula se puede administrar a un sitio en el que la fibrina insoluble está presente en el sujeto, es decir, un sitio de trombo. Los fármacos y profármacos de ese tipo incluyendo agentes trombolíticos conocidos (por ejemplo, uroquinasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno de tipo tisular), y similares. En la presente divulgación
10 también están incluidos los agentes de dirección al trombo de los fármacos y profármacos de ese tipo.

Además, en el presente documento se desvela un conjugado que comprende el anticuerpo de la presente divulgación y una parte antitumoral. El anticuerpo de la presente divulgación se une a un sitio de trombo (fibrina) en un tumor como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, mediante la conjugación del anticuerpo con la parte
15 antitumoral, la parte antitumoral se puede administrar a un tumor. Las partes antitumorales que se pueden conjugar con el anticuerpo de la presente divulgación no están limitadas en particular, siempre y cuando las partes antitumorales sean conocidas en el campo técnico. Las partes antitumorales incluyen agentes anticáncer, por ejemplo, agentes alquilantes tales como irinotecán (CPT-11), metabolitos de irinotecán SN-38 (10-hidroxi-7-etil-camptotecina), adriamicina, Taxol, 5-fluorouracilo, nimustina, y ranimustina, antimetabolitos tales como gemcitabina e hidroxycarbamida, alcaloides de plantas tales como etopósido y vincristina, antibióticos anticáncer tales como mitomicina y bleomicina, agentes de platino tales como cisplatino; agentes dirigidos por vía molecular tales como sorafenib y erlotinib, metotrexato, arabinósido de citosina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, ifosfamida, busulfano, MMAE (monometil auristatina E), DM-1 (mertansina), caliqueamicina, y similares; radioisótopos, por ejemplo, boro 10 (¹⁰B), indio 111 (¹¹¹In), itrio 90 (⁹⁰Y), y similares. La parte antitumoral tiene
20 preferentemente un peso molecular de modo que, después de la administración del conjugado de la presente divulgación a un sitio de trombo en un tejido tumoral, la parte antitumoral se puede liberar del conjugado en el sitio y alcanzar todo el tejido tumoral.

Además, el anticuerpo se puede conjugar con la parte antitumoral mediante un método conocido en el campo
30 técnico, y se puede conjugar directamente o se puede conjugar indirectamente. Por ejemplo, para la conjugación directa se puede utilizar un enlace covalente. Para la conjugación indirecta se puede utilizar la unión a través de un conector.

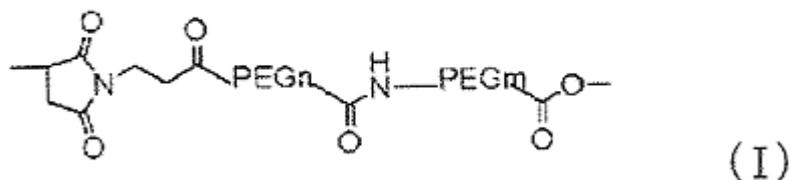
En la presente divulgación, el anticuerpo se conjuga preferentemente con la parte antitumoral a través de un
35 conector. La conjugación de las dos moléculas a través de un conector puede atenuar la antigenicidad de la parte antitumoral, que es preferente para la administración a un sujeto. Las tecnologías comunes de conectores se describen en, por ejemplo, Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; Harris, J. M. y Zalipsky, S. (eds), Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; y Veronese, F. y Harris, J. M. (eds), Peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Review 54 (4), 2002.

40 Un conector se refiere a un grupo divalente o de valencia más elevada que une dos compuestos. Los conectores que se pueden usar en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan en particular a, conectores de polialquilenglicol, grupos alquileo, péptidos, cadenas de azúcar, y otros vehículos poliméricos. El resto de alquileo de un alquilenglicol que es una unidad constitucional de un conector de polialquilenglicol tiene de 1 a 3000 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 1000 átomos de carbono, y más preferentemente de 2 a 100 átomos de carbono. El peso molecular del conector de polialquilenglicol es generalmente de 30 a 50000 Da, y preferentemente de 500 a 30000 Da. El conector de polialquilenglicol es preferentemente un conector de polietilenglicol (PEG). El grupo alquileo puede ser lineal o ramificado.

50 Además, los conectores incluyen conectores lineales (conectores divalentes) y conectores ramificados (conectores trivalentes o con valencias más elevadas). Se desvela un conector lineal con la parte antitumoral en un extremo del mismo y el anticuerpo de la presente divulgación en el otro extremo. Generalmente se proporciona un conector ramificado con la parte antitumoral en cada ramificación (cada cadena) y el anticuerpo en el otro extremo.

55 Un ejemplo específico del conector de cadena lineal es un conector de la siguiente fórmula I:

[Quím. 1]



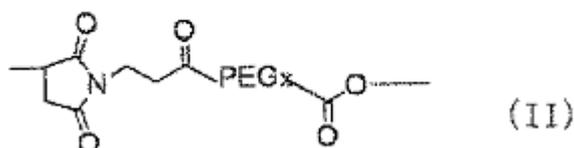
[En la fórmula, PEG es una cadena de polietilenglicol, y cada uno de n y m es el número de unidades de etilenglicol y representa independientemente un número entero de 5 a 100].

5 El conector de fórmula I generalmente se une al anticuerpo en el extremo que tiene el grupo succinimidilo, y a la parte antitumoral en el otro extremo.

Además, otro ejemplo específico del conector de cadena lineal es un conector de fórmula II:

10

[Quím. 2]



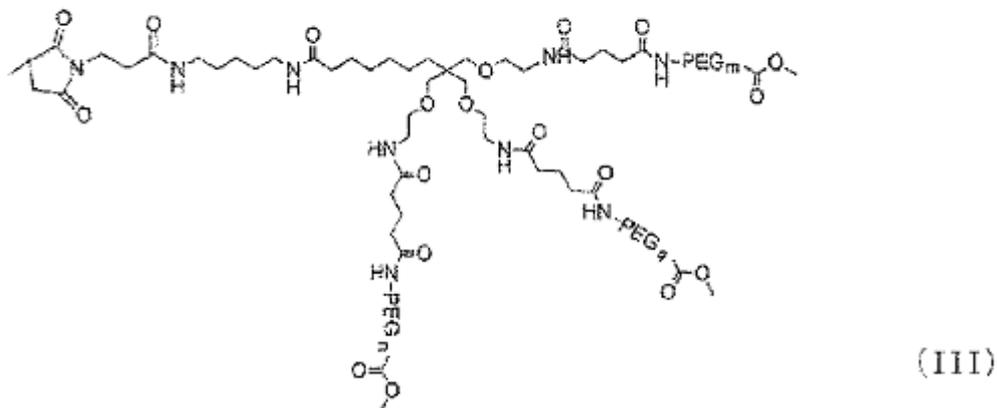
[En la fórmula, PEG es una cadena de polietilenglicol, y x es el número de unidades de etilenglicol y representa un número entero de 5 a 100].

15 El conector de fórmula II generalmente se une al anticuerpo en el extremo que tiene el grupo succinimidilo y a la parte antitumoral en el otro extremo.

Un ejemplo específico del conector ramificado es un conector de fórmula III:

20

[Quím. 3]



[En la fórmula, PEG es una cadena de polietilenglicol, y cada uno de n, m, y q es el número de unidades de etilenglicol y representa independientemente un número entero de 5 a 100].

25 El conector de fórmula III generalmente se une al anticuerpo en el extremo que tiene el grupo succinimidilo y a las partes antitumorales en los otros múltiples extremos. El conector ramificado se puede preparar, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 de PTL 7.

En este campo técnico se conocen tecnologías para la unión de un anticuerpo a una parte antitumoral a través de un conector. Por ejemplo, el enlace entre el anticuerpo y el conector es un enlace covalente o un enlace no covalente (un enlace iónico, enlace hidrófobo, o similares), y es preferentemente un enlace covalente. El enlace es preferentemente de un modo tal que cuando el conjugado de la presente divulgación se administra a un sujeto, la parte antitumoral no se libera rápidamente en la sangre. Los enlaces de este tipo incluyen un enlace entre un grupo maleimido y un grupo tiol, un enlace obtenido por una reacción entre un éster de halo y un tiol, un enlace amido entre un grupo carboxilo y un grupo amino, un enlace disulfuro entre un grupo tiol y otro grupo tiol, una base de Schiff de un grupo amino y un grupo aldehído, un enlace tioéster entre un grupo tiol y un ácido carboxílico, un enlace éster entre un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo, una formación de enlace basada en un grupo amino y un derivado de ácido escuárico (por ejemplo, escuarato de dimetilo), un enlace entre un grupo dienil aldehído y un grupo amino, y similares. Los ejemplos específicos de estos enlaces incluyen un enlace entre un grupo maleimido presente en un extremo de un conector y un grupo tiol contenido en un resto de cisteína en el anticuerpo, un enlace formado por sustitución deshidratante entre un grupo succinimido presente en un extremo de un conector y un grupo amino contenido en un resto de lisina en un anticuerpo (por ejemplo, documento WO2008/096760), un enlace formado por condensación de deshidratación entre un grupo amino presente en un extremo de un conector y un ácido carboxílico contenido en ácido aspártico o ácido glutámico en un anticuerpo (por ejemplo, se usa WSCDI), y similares. Para métodos específicos para la unión de un anticuerpo a un conector, véase, por ejemplo, el documento WO/2010/055950.

Por otra parte, el enlace entre la parte antitumoral y el anticuerpo o el conector es un enlace covalente o un enlace no covalente (un enlace iónico, enlace hidrófobo, o similares), y es preferentemente un enlace covalente. Especialmente cuando un compuesto antitumoral se usa como la parte antitumoral, el enlace es preferentemente de un modo tal que cuando el conjugado de la presente divulgación se administra a un sujeto, la parte antitumoral no se libera rápidamente en la sangre. Desde un punto de vista de este tipo, el enlace entre la parte antitumoral y el anticuerpo o el conector es preferentemente, pero no se limita a, un enlace éster, un enlace carbamato, un enlace carbonato, o un enlace tiocarbamato, y más preferentemente un enlace éster. Cuando el enlace es un enlace éster, se puede esperar que el enlace se hidrolice con una carboxilesterasa en un tejido tumoral o por vía no enzimática, de modo que la parte antitumoral se libera del conjugado de la presente divulgación en una manera de liberación sostenida. Cuando el enlace es un enlace carbamato, se puede esperar que el conjugado de anticuerpo, como tal, se asimile en las células mediante endocitosis, y a continuación se escinda con una carboxilesterasa en las células, de modo que la parte antitumoral se libera del conjugado de la presente divulgación en una manera de liberación sostenida. Cuando el enlace es un enlace carbonato, se puede esperar que el enlace se hidrolice por vía no enzimática, de modo que la parte antitumoral se libera del conjugado de la presente divulgación en una manera de liberación sostenida. Cuando el enlace es un enlace tiocarbamato bond, se puede esperar que el enlace se hidrolice por vía no enzimática, de modo que la parte antitumoral se libera del conjugado de la presente divulgación en una manera de liberación sostenida.

Cuando un compuesto antitumoral se usa como la parte antitumoral en el conjugado de la presente divulgación, el número de moléculas del compuesto antitumoral conjugado por molécula del anticuerpo no se limita en particular de forma teórica, pero es generalmente de 1 a 10, y preferentemente de 1 a 8, desde los puntos de vista de la estabilidad del conjugado, la facilidad de producción, y similares.

Para fines ilustrativos, se describe de forma específica un caso en el que SN-38 (10-hidroxi-7-etil-camptotecina) se usa como la parte antitumoral y un conector de polietilenglicol se usa como el conector. Sin embargo, incluso cuando se usa una combinación diferente, los expertos en la materia pueden producir un conjugado dirigido de la presente divulgación cambiando las condiciones de reacción, según sea adecuado.

(I) En primer lugar, la condensación por deshidratación de SN-38 y un polietilenglicol que tiene un grupo carboxilo en un extremo y que tiene un grupo amino protegido con Boc, Fmoc, o similar en el otro extremo se realiza para introducir un conector de polietilenglicol a un grupo hidroxilo de SN-38.

(II) El producto de (I) se mezcla con un polietilenglicol que tiene un grupo succinimido en un extremo y un grupo maleimido en el otro extremo para hacer reaccionar el grupo succinimido con el grupo amino del producto de (I), de modo que el grupo maleimido se introduce en el conector de polietilenglicol.

(III) El producto de (II) se mezcla con un anticuerpo para hacer reaccionar el grupo maleimido en el producto de (II) con un grupo tiol en el anticuerpo. Por lo tanto, el producto de (II) y el anticuerpo se conjugan entre sí para obtener el conjugado de la presente divulgación.

El conjugado de la presente divulgación se puede unir a fibrina insoluble en un tejido tumoral y administrar la parte antitumoral al tumor. Además, el conjugado de la presente divulgación tiene un efecto tal que permanece en el tejido tumoral durante un largo periodo de tiempo y continúa presentando un efecto antitumoral durante un largo periodo de tiempo. Por esta razón, el conjugado de la presente divulgación se puede usar como un agente para prevenir o tratar un tumor. De forma específica, mediante la administración de una cantidad eficaz del conjugado de la presente divulgación a un sujeto, un tumor en el mamífero se puede prevenir o tratar. Además, el conjugado de la presente divulgación puede presentar el efecto antitumoral durante un largo periodo de tiempo también permaneciendo en un tejido tumoral durante un largo periodo de tiempo, inhibiendo la formación de vasos sanguíneos que proporcionan nutrientes al tumor en los límites de la región del tumor.

Los tumores a tratar o prevenir en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, cáncer sólido, por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, y cáncer de pulmón.

5 El conjugado de la presente divulgación no se dirige a células cancerosas por sí mismas, sino que se dirige a la fibrina insoluble presente en un sitio de filtración de un vaso sanguíneo tumoral. El anticuerpo de la presente divulgación no reacciona con el fibrinógeno como se ha descrito anteriormente, y tiene una afinidad extremadamente elevada hacia la fibrina insoluble. Por esta razón, el conjugado de anticuerpo-parte antitumoral que tiene una bioafinidad elevada se filtra de forma selectiva desde los vasos sanguíneos tumorales debido al efecto de EPR (aumento de permeación y efecto de retención) (dado que el conjugado es un polímero, el conjugado no se filtra desde los vasos sanguíneos normales), se une a la fibrina insoluble presente en un estroma tumoral después de la filtración, y forma un punto de apoyo en ese sitio. En otras palabras, el conjugado de la presente divulgación continúa estando presente en la fibrina en el estroma durante un largo periodo de tiempo. Por ejemplo, teniendo en cuenta el Ejemplo 6 que se describe en PTL 7, cuando la parte antitumoral SN-38 se conjuga con el anticuerpo de la presente divulgación mediante un enlace éster, SN-38 se libera desde el conjugado en una manera de liberación sostenida mediante una carboxilesterasa en un tumor o de forma espontánea. Dado que SN-38 es una molécula que tiene un bajo peso molecular, es posible de forma extremadamente elevada que SN-38 se desplace con frecuencia en el tejido canceroso de una forma relativamente libre, se extienda con respecto a todo el cáncer, y ataque de forma eficaz a las células cancerosas. Además, dado que el efecto antitumoral de SN-38 es dependiente del tiempo, una exposición de ese tipo de células cancerosas a SN-38 durante un largo periodo de tiempo puede eliminar las células cancerosas de forma eficaz.

Los agentes de la presente divulgación, incluyendo el agente para visualizar un trombo que se ha descrito anteriormente y el agente que se ha descrito anteriormente para prevenir o tratar un tumor, también pueden comprender vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables además del anticuerpo. Los ejemplos de los vehículos y aditivos de este tipo incluyen agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, alginato sódico, dextrano soluble en agua, San sódica de carboximetilo y almidón, pectina, goma de xantano, goma arábica, caseína, gelatina, goma de agar, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, Vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, manitol, sorbitol, lactosa, y similares. Un aditivo usado o una combinación de aditivos usados se seleccionan entre los que se han descrito anteriormente, si fuera apropiado, dependiendo de la forma de dosificación.

Un método para administrar el agente de la presente divulgación no se limita en particular, y el agente de la presente divulgación se puede administrar mediante administración oral o administración parenteral, por ejemplo, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transdérmica, administración rectal, o administración nasal.

Cuando el agente de la presente divulgación se administra por vía oral, el agente se puede presentar en forma de uno cualquiera de comprimidos, cápsulas (cápsulas duras, cápsulas blandas, microcápsulas, y similares), gránulos, polvos, píldoras, trociscos, soluciones acuosas orales, líquidos, suspensiones, emulsiones, jarabes y similares, o puede ser un producto seco que se vuelve a disolver antes de su uso. Por otra parte, cuando la gente de la presente divulgación se administra por vía parenteral, es posible seleccionar una forma de dosificación, por ejemplo, a partir de inyecciones (por ejemplo, soluciones, emulsiones y suspensiones) para inyección intravenosa (incluyendo infusión), inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea, agentes externos tales como pomadas (especialmente, pomadas oftálmicas), cremas, supositorios, cataplasmas, soluciones oftálmicas, soluciones para instilación por la nariz, agentes de inhalación, linimentos, y aerosoles, y similares. Cuando el agente de la presente divulgación se presenta en forma de una inyección, el agente de la presente divulgación se proporciona en el estado de una ampolla de dosis unitaria o un recipiente de múltiples dosificaciones.

Estas diversas preparaciones farmacéuticas se pueden producir de una manera habitual, seleccionando las adecuadas a partir de excipientes, agentes para aumentar el volumen, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, lubricantes, tensioactivos, dispersantes, agentes de tamponamiento, agentes para ajuste del pH, conservantes, solubilizantes, antisépticos, modificadores del sabor, potenciadores de la absorción, agentes lenitivos, estabilizantes, agentes para ajuste de la tonicidad, similares usados generalmente para agentes farmacéuticos.

El anticuerpo o el conjugado mezclado en el agente de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, de un 1 a un 99 % en peso y preferentemente de un 5 a un 90 % basándose en el peso total, aunque la cantidad varía dependiendo del tipo del anticuerpo, los tipos del conjugado y la parte antitumoral contenida en el conjugado, la aplicación de los mismos, la forma de dosificación, la vía de administración, y similares.

Además, la cantidad del agente de la presente divulgación administrar y los intervalos de la administración varían dependiendo del tipo del anticuerpo contenido en el agente, el tipo de la parte antitumoral contenida en el conjugado, el sujeto al que se le administra el agente, la edad y el peso corporal del sujeto, la vía de administración, y el número de veces de administración, y se puede cambiar con respecto a amplios intervalos.

El sujeto al que se le administra el agente de la presente divulgación no está limitado en particular, e incluye

mamíferos, por ejemplo, ser humano, animales domésticos (ganado, cerdos, y similares), animales de compañía (perro, gato, y similares), animales experimentales (ratón, rata, mono, y similares). Es particularmente preferente usar el agente de la presente divulgación para un sujeto con una enfermedad de la que se sospecha que está relacionada con un trombo o un sujeto con una enfermedad relacionada con un trombo. Además, es particularmente preferente usar el agente que comprende el conjugado de la presente divulgación para un sujeto en el que se sospecha de la presencia de un tumor o para un sujeto que tiene un tumor.

En el caso del agente para visualizar un trombo, después de la administración del agente, la presencia o la posición del anticuerpo en un sujeto se visualizan usando una etiqueta como un índice. Preferentemente, la presencia o la posición del anticuerpo se visualizan con una tecnología de formación de imágenes conocidas. Como la tecnología de formación de imágenes, se puede usar la tomografía computarizada (CT), tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (MRI), u otros sistemas de formación de imágenes *in vivo*, aunque varía dependiendo de la etiqueta usada, el tipo de sujeto, el sitio del que se van a formar imágenes, y similares. Esto hace posible visualizar la presencia o la posición de un trombo en un sujeto basándose en la etiqueta del anticuerpo.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá de forma más específica basándose en los Ejemplos y Ejemplos y de Referencia; sin embargo, la presente divulgación no se limita a los Ejemplos que siguen a continuación.

En primer lugar, los presentes inventores evaluaron las propiedades y funciones del anticuerpo desarrollado previamente que se unía la fibrina y que no se une al fibrinógeno, en particular, un anticuerpo quimérico obtenido a partir del anticuerpo producido por el hibridoma 102-10 con N.º de Registro NITE P-923 (en lo sucesivo en el presente documento, este anticuerpo también se denomina "anticuerpo 102-10"), como se describe a continuación. Observar que, para el anticuerpo 102-10, véase PTL 7 (Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N.º 2012-72).

(Ejemplo de Referencia 1)

La especificidad de fibrina del anticuerpo 102-10 se analizó con el método que se muestra a continuación.

<ELISA>

Cada placa cuyos pocillos se revistieron con fibrinógeno (placa de fibrinógeno) se preparó como sigue a continuación. De forma específica, el fibrinógeno de ser humano o ratón (fabricado por Sigma, diluido con PBS) se añadió a una placa de jabón Maxi (fabricada por Nunc) a 1 µg/100 µl/pocillo, y la placa se cerró herméticamente, y se permitió que reposara a 4 °C durante una noche.

Cada placa de fibrina se preparó como sigue a continuación. De forma específica, 100 µl de TBS que contenía 0,05 NIHU/ml de trombina (fabricado por Sigma), CaCl₂ 1 mM, y L-cisteína 7 mM (fabricado por Merck) se añadió a los pocillos de la placa de fibrinógeno, que a continuación se lavó con TBS-T, y se bloqueó con N102 (fabricado por NOF CORPORATION).

Además, el anticuerpo 102-10 se etiquetó con peroxidasa usando NH₂ del Kit de Etiquetado de Peroxidasa (fabricado por DOJINDO). Además, el anticuerpo 102-10 etiquetado se preparó a 1 µg/ml con Block Ace (fabricado por DS Pharma Biomedical Co., Ltd.).

A continuación, 100 µg de esta solución de anticuerpo diluida se añadió a la placa de fibrinógeno y la placa de fibrina, que a continuación se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, cada placa se lavó con TBS-T, y se añadieron 100 µl de 1-Step Slow TMB (fabricado por Thermo), y se realizó colorimetría. La reacción de parada se realizó añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2 N. Además, la absorbancia (D.O.) se obtuvo mediante la medición de la absorción y una longitud de onda de absorción de 450 nm con SPECTRA MAX190 (fabricado por Molecular Devices Japan KK). La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos.

<Tratamiento Enzimático de Fibrina Insoluble >

TBS que contenía 10 mg de fibrinógeno, CaCl₂ 0,02 M, 2,5 NIHU/ml de trombina, y L-cisteína 7 mM se incubó en un tubo de 1,5 ml a 37 °C durante 1 hora para preparar coágulos de fibrina.

Los coágulos de fibrina se degradaron añadiendo, a los coágulos de fibrina obtenidos de ese modo, 2 µg/ml de elastasa (fabricado por Sigma), 70 µg/ml de calicreína (fabricado por Sigma), 10 µg/ml de catepsina B (fabricado por Sigma), 210 Unidades/ml de catepsina D (fabricado por Sigma), 200 ng/ml de MMP-9 (fabricado por Sigma), o

plasmina 0,1 μ M (fabricado por American diagnostica).

A continuación, cada producto de degradación se revistió sobre una placa de ELISA, y la reactividad del anticuerpo 102-10 etiquetado se analizó. La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos.

5 <Comparación con Anticuerpos Disponibles en el Mercado>

Los siguientes dos anticuerpos anti-fibrina disponibles en el mercado se etiquetaron con peroxidasa:

10 NYB-T2G1 (fabricado por Accurate Chemical and Scientific), y
MH-1 (fabricado por American Tissue and Cell Culture).

15 A continuación, las afinidades de estos anticuerpos etiquetados y el anticuerpo 102-10 etiquetado que se ha descrito anteriormente se analizaron usando placas de ELISA cada una revestida con 1 μ g de uno de fibrina, fibrinógeno, y dímero D (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.). La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos.

20 Tal como es evidente a partir de los resultados que se muestran en la Fig. 1, el anticuerpo 102-10 presentaba altas afinidades con respecto a la fibrina insoluble tanto de ser humano como de ratón, pero no se observó afinidad hacia el fibrinógeno.

Además, como se muestra en la Fig. 2, se ha mostrado que el anticuerpo 102-10 se une a la fibrina insoluble, pero no se une a las fibrinas solubles (FDP: productos de degradación de fibrina) obtenidas por tratamiento de la fibrina insoluble con diversas enzimas.

25 Además, como se muestra en la Fig. 3, NYB-T2G1 presentaba una baja afinidad hacia cada uno de fibrina insoluble y dímero D, porque el epítipo de NYB-T2G1 cubría después de la polimerización de la fibrina. Por otra parte, MH-1 presentaba una alta afinidad hacia la fibrina soluble (dímero D), pero una baja afinidad hacia la fibrina depositada (fibrina insoluble) tal como en el caso de NYB-T2G1. Por otro lado, el anticuerpo 102-10 no presentaba afinidad hacia fibrinógeno o dímero D, y presentaba una afinidad elevada solamente hacia la fibrina insoluble depositada.

30 **(Ejemplo de Referencia 2)**

La inmunotinción se realizó con el anticuerpo 102-10 con el método que se muestra a continuación para intentar la detección de la formación de fibrina en muestras de tejido.

35 <Tinción Inmunohistológica>

40 Cada muestra de tejido embebida en parafina se sometió a un tratamiento de desparafinización, y la recuperación del antígeno se realizó con tampón citrato 10 mM (pH 6) a 120 °C durante 10 minutos. A continuación de un tratamiento de bloqueo que se realizó con leche desnatada al 5 %/PBS, la muestra se incubó con 10 μ g/ml del anticuerpo 102-10 a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Posteriormente, la muestra se incubó con un anticuerpo secundario de IgG anti-humana etiquetada con peroxidasa (fabricado por MBL) durante 60 minutos. A continuación, después de tinción con DAB (fabricado por Dako), los núcleos se tiñeron con hematoxilina (fabricado por MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD.). Las Figs. 4 a 6 muestran los resultados obtenidos.

45 Tal como es evidente a partir de los resultados que se muestran en la Fig. 4, la formación de fibrina no se detectaba con el anticuerpo 102-10 en los tejidos normales. Por el contrario, la formación de fibrina se detectó con el anticuerpo 102-10 en cada uno del tejido de cerebro, tejido de pulmón, y tejido de páncreas cancerosos. Además, como se muestra en la Fig. 5, la fibrina se detectó con el anticuerpo 102-10 en cáncer de colon y adenoma de colon como en los casos del tumor cerebral, el cáncer de pulmón, y el cáncer pancreático que se han descrito anteriormente. Sin embargo, la formación de fibrina no se observó en linfadenitis reactiva (linfoma). Como se ha descrito anteriormente, se ha encontrado que el anticuerpo 102-10 puede detectar formación de fibrina específica de cáncer (formación persistente asintomática de fibrina).

55 Además, aunque no se muestran en las figuras, la fibrina se detectó con el anticuerpo 102-10 al inicio de cada uno de infarto cerebral e infarto de miocardio. Por otro lado, como se muestra en la Fig. 6, no se observó formación de fibrina y la desaparición de la fibrina se observó tres semanas después del inicio de cada uno del infarto cerebral y el infarto de miocardio.

60 Además, como se muestra en la Fig. 6, la fibrina se detectó con el anticuerpo 102-10 en pancreatitis aguda, pero la formación de fibrina de ese tipo no se observó en la pancreatitis crónica.

(Ejemplo de Referencia 3)

65 El rendimiento de la detección de fibrina del anticuerpo 102-10 se evaluó con el método que se muestra a continuación usando animales para modelos de enfermedad en los que se formaron trombos.

<Modelos Animales>

Un modelo de cáncer inducido por vía química se preparó como sigue a continuación. De forma específica, un ratón FVB/N hembra se rasuró, un DMBA diluido con acetona (250 µg/ml, fabricado por Sigma) se aplicó sobre el ratón una sola vez, y una semana más tarde cada semana después de eso, se aplicó PMA diluido con acetona (25 µg/ml, fabricado por Sigma) en el ratón hasta la semana 32.

Un modelo de infarto cerebral se preparó como sigue a continuación. De forma específica, una rata Sprague-Dawley hembra se anestesió con isoflurano (fabricado por Abbott). A continuación, la arteria carótida interna se expuso, y se canuló con un tubo de polietileno (con un diámetro interno de 0,5 mm). Además, en la arteria cerebral media, se estimuló una embolia con un filamento de nailon de 3-0 (fabricado por Ethicon).

Para la preparación de un modelo de inflamación, 2 mg de un anticuerpo anti-colágeno de tipo II (fabricado por Chondrex) y un anticuerpo anti-colágeno de tipo IV (Clon 35-4, establecido por el laboratorio al que pertenecen los presentes inventores) se administró por vía intraperitoneal a un ratón DBA/1J hembra el Día 0. Además, se administraron 50 µg de LPS (fabricado por Chondrex) por vía intraperitoneal tres días más tarde.

Un modelo de curación de heridas se preparó como sigue a continuación. De forma específica, un ratón FVB/N hembra se anestesió con isoflurano, y se creó una herida de 1 cm en el lomo del ratón. A continuación, cada día se observaba cómo se curaba la herida, sin tratar la herida.

Los animales de los tres modelos que se han descrito anteriormente (el modelo de infarto cerebral, el modelo de inflamación, y el modelo de curación de heridas) en los que se produjo formación de trombo también se analizaron mediante tinción inmunohistológica usando el anticuerpo 102-10. La Fig. 7 muestra los resultados obtenidos.

<Preparación de Sonda de PET>

El anticuerpo 102-10 y la p-isotiocianatobencil-desferrioxamina B (DF, fabricado por MacroCyclics) se conjugaron con una proporción de DF con respecto al anticuerpo que era de 1:1 a 1:3, y se purificó con Sephadex G-50 (GE). Por otra parte, el oxalato de ⁸⁹Zr se preparó en un ciclotrón. A continuación, el anticuerpo 102-10 conjugado con DF (100 µg/20 µl de PBS) y de 5,0 a 5,6 MBq de oxalato de ⁸⁹Zr (de 3,7 a 5,6 GBq/ml, pH de 7 a 9) se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de purificación con Sephadex G-50. La sonda de PET obtenida de este modo (véase la Fig. 8) consiguió un rendimiento radioquímico de un 73 a un 96 %, tenía una pureza de un 96 a un 98 %, y consiguió una actividad específica de 37 a 44 kBq/µg que se midió mediante cromatografía en capa fina usando DTPA 50 mM.

<PET/CT>

El modelo de cáncer inducido por vía química se sometió a PET/CT usando la sonda de PET. De forma específica, 3,7 MBq de la sonda PET se administraron al ratón del modelo de cáncer inducido por vía química a través de la vena de la cola con la cantidad del anticuerpo administrará siendo de 100 µg/ratón en términos del anticuerpo no etiquetado. Los datos de PET se adquirieron tomando imágenes usando un sistema de PET "Inveon" para animales pequeños con anestesia de 10 a 20 minutos. La temperatura del cuerpo se mantuvo a 37 °C usando una lámpara o una almohadilla de temperatura constante. Las imágenes se procesaron con el método de probabilidad *a posteriori* máximo de 3D (3D máximo *a posteriori*; 18 repeticiones con 16 subconjuntos, resolución de $\beta = 0,2$), sin corrección por desintegración. A continuación del barrido de PET, las imágenes de CT se obtuvieron con un sistema de PEmCT2" para animales pequeños (fabricado por Rigaku Corporation) usando una fuente de luz de rayos X a 90 kVp y 200 µA. La Fig. 9 muestra los resultados obtenidos.

Además, después de la fotografía de rayos X, se extrajo un tumor y se embebió a -20 °C usando un agente de embebido de tejido congelado (compuesto de temperatura óptima de corte (OCT), Sakura Finetek Japan Co., Ltd.). Una sección seca con un grosor de 20 µm se expuso a la luz usando una placa de formación de imágenes (fabricada por FUJIFILM Corporation), y se tiñó (tinción con H & E) con hematoxilina y eosina (fabricado por MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD.). Además, el tumor extraído se analizó también mediante inmunotinción con el anticuerpo 102-10 y mediante autorradiografía usando el anticuerpo como una sonda. La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos.

Tal como se muestra en la Fig. 7, la fibrina se detectó con el anticuerpo 102-10 al inicio o en el momento de la creación de la herida de cada uno del infarto cerebral, la artritis, y la lesión cutánea, pero se encontró que la fibrina desaparecía de 2 a número de semanas después del inicio o similar en cada uno de los modelos de enfermedad y el modelo de herida, al igual que en los casos de los resultados del análisis del infarto cerebral y del infarto de miocardio que se muestran en la Fig. 6.

Además, como se muestra en las Figs. 9 y 10, se encontró que el anticuerpo 102-10 etiquetado de forma radiactiva se acumulaba de forma específica de tumor en el cuerpo del modelo de cáncer inducido por vía química.

Por consiguiente, se ha mostrado que el anticuerpo 102-10 puede detectar la fibrina de forma específica no solamente *in vitro* sino también *in vivo*. Además, también se ha encontrado que el anticuerpo 102-10 se puede utilizar para detectar el cáncer en un organismo vivo a través de una detección de fibrina de ese tipo. Además, también se ha encontrado que, en el caso de una enfermedad benigna tal como infarto cerebral, infarto de miocardio, o enfermedad inflamatoria, un estado de la enfermedad (información del progreso) también se puede obtener a través de la detección de fibrina de ese tipo.

(Ejemplo de Referencia 4)

La detección de moléculas de fibrina en un coágulo de fibrina con el anticuerpo 102-10 se intentó con el método que se muestra a continuación. Además, también se analizó la presencia o ausencia de afinidad del anticuerpo 102-10 para cada uno de fibrinógeno no reducido y fibrinógeno reducido.

<Tinción Inmunofluorescente de Secciones de Fibrina Humana>

Los coágulos de fibrina preparados con el mismo método tal como se describe en el Ejemplo de Referencia 1 se congelaron usando el compuesto OCT para preparar secciones congeladas con un grosor de 6 μm . Estas secciones congeladas se secaron al aire, a continuación se lavaron con PBS, y se bloquearon con leche desnatada al 5 %/PBS. A continuación, el anticuerpo 102-10 etiquetado con el kit de etiquetado de proteína Alexa Folur 647 (fabricado por Invitrogen) se añadió, seguido de incubación durante 1 hora. A continuación, las secciones se sellaron herméticamente con Fluoromount G (fabricado por Southern Biotec). A continuación, las muestras preparadas de este modo se observaron con un microscopio de fluorescencia. La Fig. 11 muestra un resultado obtenido.

<Transferencia de Western>

Cada uno de los fibrinógenos (1 μg) de ser humano y ratón se diluyeron con cada uno de un tampón de muestra que contenía 2-mercaptoetanol al 5 % (2-ME) (fabricado por Bio-Rad) y un tampón de muestra que no contenía 2-mercaptoetanol (fabricado por Bio-Rad). A continuación, solamente las muestras diluidas con el tampón de muestra que contenía 2-ME se sometieron a un tratamiento térmico a 96 °C durante 5 minutos. A continuación, estas muestras se aplicaron sobre gel de TGX al 4-20 % (fabricado por Bio-Rad), y se sometieron a electroforesis con un voltaje constante de 200 V durante 30 minutos. El gel después de la electroforesis se transfirió a Trans-Blot Turbo Mini PVDF (fabricado por Bio-Rad) en las condiciones de 2,5 A, 25 V, y 7 minutos. A continuación de la transferencia a la membrana se transfirió a SNAP i.d. (fabricado por Millipore), y se bloqueó con leche desnatada al 0,3 %/PBS-T al 0,1 %. A continuación, la membrana se incubó junto con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo 102-10 etiquetado con peroxidasa para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo. Posteriormente, después de lavar la membrana con PBS-T, la quimioluminiscencia fue producida por ECL Prime (fabricado por GE) para detectar los antígenos a los que se unía el anticuerpo 102-10 etiquetado con peroxidasa. La Fig. 13 muestra los resultados obtenidos.

Además, después de esta detección, la membrana se lavó con PBS-T, y a continuación se tiñó con Azul Brillante de Coomassie (CBB). La Fig. 12 muestra los resultados obtenidos.

Nótese que los pesos moleculares de las tres cadenas que constituyen el fibrinógeno son como sigue a continuación. De forma específica, el peso molecular de la cadena A α es de aproximadamente 67 KDa, el peso molecular de la cadena B β es de aproximadamente 56 KDa, y el peso molecular de la cadena γ es de aproximadamente 48 KDa.

Tal como es evidente a partir de los resultados que se muestran en la Fig. 11, un coágulo de fibrina se tiñó como una malla con el anticuerpo 102-10 como reflejo del estado en el que las moléculas de fibrina se reticulada van en el coágulo de fibrina.

Además, como se muestra en las Figs. 12 y 13, el anticuerpo 102-10 no conseguía detectar fibrinógeno en el estado no reducido como en los casos de los resultados se muestran en los Ejemplos de Referencia 1 a 3.. Por el contrario, se ha mostrado que el anticuerpo 102-10 puede detectar la cadena B β (peso molecular: aproximadamente 56 kDa) de fibrinógeno en un estado reducido en el que se rompe la formación del complejo. Por consiguiente, se ha encontrado que el epítipo del anticuerpo 102-10 está presente en un sitio en la cadena B β de fibrinógeno expuesto mediante desnaturalización (reducción).

(Ejemplo de Referencia 5)

La identificación del epítipo del anticuerpo 102-10 se intentó con el método que se muestra a continuación.

<Secuenciación de Aminoácidos>

El fibrinógeno reducido y sometido a tratamiento térmico con el método que se ha descrito en el Ejemplo de Referencia 4 se desarrolló mediante SDS-PAGE. Posteriormente, la cadena B β de fibrinógeno se extrajo del gel usando EzStain Reverse y ATTOPREP MF (ambos fabricados por Atto). La cadena B β de fibrinógeno extraída se

escindió con lisil endopeptidasa. A continuación, a partir de los péptidos escindidos de la cadena B β de fibrinógeno, un fragmento de péptido que se unía al anticuerpo 102-10 y que tenía el peso molecular más pequeño se extrajo mediante transferencia de Western. Posteriormente, este fragmento de péptido se sometió a secuenciación de aminoácidos.

En consecuencia, se ha encontrado que el epítipo del anticuerpo 102-10 está presente en la región (86 aminoácidos) que varía desde la histidina en la posición 179 a la lisina en la posición 264 de la cadena B β de fibrinógeno (SEQ ID NO: 19) (véase la Fig. 14). A continuación, para reducir el epítipo del anticuerpo 102-10, se realizó un experimento con el método que se muestra a continuación.

<Experimento de Inhibición Competitiva>

La región que se ha descrito anteriormente formada por los 86 aminoácidos se dividió adicionalmente en cinco subsecciones para preparar péptidos sintéticos. Un experimento de inhibición competitiva se realizó usando estos péptidos. De forma específica, cada uno de los péptidos sintéticos diluidos en serie de 0,01 a 100 μ M se añadió a 1 μ g/ml del anticuerpo 102-10, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A una placa de fibrina, se añadieron 100 μ l de cada una de las soluciones de la mezcla del anticuerpo y los péptidos, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, la placa se lavó con TBS-T, y se añadieron 100 μ l de 1-Step Slow TMB (fabricado por Thermo) para realizar colorimetría durante 5 minutos. La reacción de parada se realizó añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 2 N. Además, la absorbancia se obtuvo por medición de la absorbancia a una longitud de onda de absorción de 450 nm con SPECTRA MAX190 (fabricado por Molecular Devices Japan KK). La Fig. 15 muestra parte de los resultados obtenidos. Nótese que las secuencias de Fib-1, Fib-3, N.º 1, y N.º 5 que se muestran en la Fig. 15 son las que siguen a continuación.

Fib-1: NIPVVSGKECEEIIRKGGETS (Posiciones 179 a 252 de la cadena B β de fibrinógeno, SEQ ID NO: 21)
 Fib-3: CNIPVVSGKE (Posiciones 231 a 240 de la cadena B β de fibrinógeno, SEQ ID NO: 22)
 N.º 1: HQLYIDETVNSNIPTNLRVLSILENLRK (Posiciones 179 a 208 de la cadena B β de fibrinógeno, SEQ ID NO: 23)
 N.º 5: CNIPVVSGKECEEIIR (Posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno, SEQ ID NO: 1)

Además, también se prepararon conjugados (Fib-1 KLH y Fib-3 KLH) de Fib-1 y Fib-3 a una proteína vehículo (KLH), y se sometieron al experimento de inhibición competitiva.

Tal como es evidente a partir de los resultados que se muestran en la Fig. 15, en la región formada por los 86 aminoácidos (Posiciones 179 a 264 de la cadena B β de fibrinógeno), el anticuerpo 102-10 se unía solamente al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 (N.º 5), y no se unía al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 240 (Fib-3 KLH) incluido en el N.º 5. Por consiguiente, se ha encontrado que el epítipo del anticuerpo 102-10 es el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno (los aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 1).

Además, el fibrinógeno se convierte en un monómero de fibrina en un caso en el que la cadena B β de fibrinógeno se escinde entre la arginina en la posición 44 y la glicina en la posición 45 con trombina para retirar el fibrinopéptido B (un polipéptido que comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 44 de la cadena B β de fibrinógeno) u otros casos. Cuando el monómeros y polimeriza y se reticulada, se forma fibrina insoluble. Por consiguiente, el epítipo del anticuerpo 102-10 en la fibrina insoluble es el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 187 a 202 de la cadena β de fibrinógeno (una proteína obtenida o retirada de fibrinopéptido B de la cadena B β de fibrinógeno).

Además, también cuando la cadena A β de fibrinógeno se escinde para retirar fibrinopéptido A, a la vez que se mantiene la cadena B β de fibrinógeno, otro monómero de fibrina polimerizable se forma a partir de fibrinógeno. Por consiguiente, el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno puede ser un epítipo del anticuerpo 102-10 también en fibrina insoluble.

A continuación, el epítipo identificado del anticuerpo 102-10 se analizó mediante simulación informática. Por consiguiente, se ha encontrado que el epítipo es una región que se une a la cadena γ y en la molécula de fibrinógeno (véase la Fig. 16, la flecha en la figura apunta hacia el epítipo del anticuerpo 102-10). Además, también se ha encontrado que el sitio de la cadena γ que se une a la cadena B β es una región (KNWIQYKEGFGHLSP, SEQ ID NO: 2) que varía desde la lisina en la posición 232 a la prolina en la posición 246 de la cadena γ de fibrinógeno (SEQ ID NO: 20).

60 (Ejemplo 1)

Preparación de Anticuerpos de la Presente Divulgación

A partir de los resultados de la simulación informática que se muestra en el Ejemplo de Referencia 5, el anticuerpo 102-10 no se puede unir a fibrinógeno, supuestamente debido a que el epítipo del anticuerpo es una región escondida en la molécula. Además, el fibrinógeno se escinde con trombina para forma monómeros de fibrina, y

adicionalmente los monómeros de fibrina se polimerizan y se reticulan para convertirse en fibrina insoluble. El anticuerpo 102-10 se puede unir a fibrina insoluble, supuestamente debido a que este cambio estructural causa la exposición de la región escondida en la molécula de fibrinógeno.

5 En este sentido, basándose en la suposición de que el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno y el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno es extremadamente útil para la preparación de un anticuerpo que se une a fibrina insoluble pero que no se une a fibrinógeno, la preparación de anticuerpos usando cada uno de estos sitios como un antígeno se intentó con el método que se muestra a continuación.

10

<Preparación de Antígenos>

En primer lugar, cada uno de los genes antigénicos que codifican el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena β de fibrinógeno o el sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno se insertaron en un sitio de enzima de restricción (NdeI-HindIII) de pET21b. Por lo tanto, se prepararon los ADN de plásmido capaces de expresar un péptido antigénico fusionado con una etiqueta de histidina. A continuación, cada uno de estos ADN de plásmido se introdujo en BL21 de *E. coli* (DE3) (fabricado por Novagen).

15

20 A continuación, la *E. coli* se inóculo en 200 ml de medio de cultivo de LB, y se cultivó a 37 °C y a 100 rpm. Cuando la DO600 del medio de cultivo alcanzó de 0,6 a 0,8, el cultivo se detuvo temporalmente, y el medio de cultivo se dejó en reposo durante 15 minutos en hielo. Después de eso, se añadió IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido) a una concentración final de 1 mM al medio de cultivo, y a continuación el cultivo a baja temperatura se realizó a 18 °C y a 100 rpm. A continuación, después de la adición de IPTG (inducción de la expresión del gen antigénico), la *E. coli* cultivó durante 16 horas, y las células se recogieron mediante centrifugación a 48.820 g durante 15 minutos.

25

Después de la recogida de las células, las células se suspendieron en Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía NaCl 500 mM, y se interrumpieron mediante sonicación en hielo. Después de la interrupción, la centrifugación se realizó a 48.820 g durante 60 minutos, y el sobrenadante se recuperó. Posteriormente, el sobrenadante recuperado se pasó a través de 1 ml de agarosa Ni-NTA (fabricado por Invitrogen) equilibrado con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía NaCl 500 mM. La agarosa se lavó con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía imidazol 5 mM y NaCl 500 mM. A continuación, un péptido antigénico atrapado por la agarosa Ni-NTA se eluyó con PBS(-) que contenía imidazol 100 mM. El tampón del péptido antigénico obtenido se intercambió con PBS(-) mediante ultrafiltración usando Amicon Ultra-15 10K (fabricado por Millipore). Además, la pureza del péptido antigénico purificado se comprobó por SDS-PAGE usando SDS-Page al 10-20 % (fabricado por DRC).

30

35

<Preparación de Anticuerpos>

La preparación de un anticuerpo capaz de unirse al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 232 a 246 de la cadena γ de fibrinógeno (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "anticuerpo anti-cadena γ ") de externalizó a ITM CO., LTD. De forma específica, el péptido antigénico obtenido a partir de la cadena γ y preparado como se ha descrito anteriormente se inyectó por vía intramuscular en la base de la cola de ratón. A continuación, un anticuerpo monoclonal se preparó usando ganglio linfático ilíaco del ratón (véase el método de ganglio linfático ilíaco de ratón, Sado Y. *et al.*, Acta Histochem. Cytochem., 2006, vol. 39, pp 89 a 94). Un anticuerpo capaz de unirse al sitio que comprende los aminoácidos en las posiciones 231 a 246 de la cadena B β de fibrinógeno (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "anticuerpo anti-cadena β ") se preparó con el método que sigue a continuación.

40

45

En primer lugar, la etiqueta de histidina del péptido antigénico obtenido a partir de la cadena β preparado como se ha descrito anteriormente incluyó con una etiqueta 4M de una manera habitual. A continuación, el péptido antigénico fusionado con la etiqueta 4M (un inmunógeno) se administró a seis ratones. En la administración inicial, una emulsión obtenida por mezcla de FCA con el inmunógeno preparado para una concentración del inmunógeno de 50 ug/ratón se administró por vía intraperitoneal. La inmunización adicional se realizó cada 2 a 3 semanas, para lo que 50 ug del inmunógeno mezclado con 200 ul del Sistema de Adyuvante de Sigma se administraron por vía intraperitoneal a los ratones.

50

55

En la tercera inmunización adicional y posteriormente, la sangre se recogió a través de la vena de la cola de los ratones inmunizados 7 días después de la administración. La sangre se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos para separar los componentes del suero, que se almacenaron congelados a -30 °C hasta la medición. A continuación, los títulos de anticuerpo de los anticuerpos anti-fibrina contenidos en estos componentes del suero (antisueros de ratones inmunizados) se evaluaron con un método de ELISA usando placas revestidas con el inmunógeno, fibrinógeno, o fibrina, y se examinó el cambio de los títulos de anticuerpo.

60

En consecuencia, la inmunización final se realizó en un ratón en el que se observó el aumento del título de anticuerpo, mediante la administración de 50 ug del inmunógeno disuelto en PBS a través de la vena de la cola. A continuación, 4 días después de la inmunización final, el bazo se extrajo del ratón, y se obtuvieron células

65

esplénicas. Todas las células esplénicas obtenidas se fusionaron con células de mieloma de ratón p3.X63 mediante el método de PEG. Las células fusionadas obtenidas se suspendieron en un medio de cultivo para fusión celular, y se sembraron sobre una placa de 96 pocillos a 2.0310^5 células/pocillos en términos de células esplénicas, y se cultivaron.

5 Los sobrenadantes del cultivo de hibridoma obtenidos mediante el cultivo se evaluaron con un método de ELISA usando una placa revestida con el inmunógeno para realizar una identificación sistemática primaria. A continuación, los hibridomas de los que se determinó que eran positivos en la identificación sistemática primaria se evaluaron con un método de ELISA usando placas revestidas con el inmunógeno, fibrinógeno, o fibrina para realizar la
10 identificación sistemática secundaria. A continuación, los hibridomas de los que se determinó que eran positivos en la identificación sistemática fundaría se seleccionaron como hibridomas que producían un anticuerpo capaz de unirse a la fibrina pero incapaces de unirse al fibrinógeno, y los hibridomas monoclonales se obtuvieron con el método de dilución limitante.

15 (Ejemplo 2)

Los anticuerpos anti-cadena β y los anticuerpos anti-cadena γ preparados en el Ejemplo 1 compararon con el anticuerpo 102-10 con un método de ELISA se muestra a continuación. Nótese que, entre los hibridomas establecidos en el Ejemplo 1, los hibridomas Fib-0355 y Fib-03435 se seleccionaron, y los anticuerpos producidos
20 por estos hibridomas se sometieron como anticuerpos anti-cadena β al método de ELISA que se muestra a continuación. Por otra parte, entre los hibridomas establecidos en el Ejemplo 1, los hibridomas 13-30 y 34-105 Se seleccionaron, y los anticuerpos producidos por estos hibridomas se sometieron como anticuerpos anti-cadena γ Al método de ELISA que se muestra a continuación.

25 <Método de ELISA>

Cada una de las soluciones de anticuerpo (100 μ l cada una) a 10 μ g/ml se añadió a la placa de fibrina y la placa de fibrinógeno, y se permitió que reposaran a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación del lavado con TBS-T, IgG-HRP Betil Anti-Humano (dilución de x1000) o IgG-HRP Betil Anti-Ratón (dilución a x10000) se añadió como
30 un anticuerpo secundario. A continuación, después de lavar con TBS-T, la colorimetría se realizó con OPD durante 10 minutos, y la medición se realizó a una longitud de onda de absorción de 492 nm. La Fig. 16 muestra los resultados obtenidos.

Tal como es evidente a partir de los resultados que se muestran en la Fig. 17, cada uno de los anticuerpos anti-cadena β y anticuerpos anti-cadena γ preparados en la actualidad no se unían al fibrinógeno y presentaban una afinidad elevada hacia la fibrina insoluble.

Además, se mostró que la afinidad hacia la fibrina insoluble (la absorbancia a 492 nm) de cada uno de sus anticuerpos era mucho más elevada que la del anticuerpo 102-10. De forma específica, las afinidades del anticuerpo
40 Fib-0355, el anticuerpo Fib-3435, el anticuerpo 13-30, y el anticuerpo 34-105 para la fibrina insoluble eran respectivamente 12 veces, 9 veces, 6 veces, y 16 veces que la del anticuerpo 102-10.

Además, la proporción de la afinidad hacia la fibrina insoluble con respecto a la afinidad hacia el fibrinógeno (la absorbancia a 492 nm) era 13 veces para el anticuerpo Fib-0355, 18 veces para el anticuerpo Fib-3435, 140 veces
45 para el anticuerpo 13-30, 25 veces para el anticuerpo 34-105, y 3 veces para el anticuerpo 102-10. Cada uno de los anticuerpos anti-cadena β y anticuerpos anti-cadena γ preparados en la actualidad presentaban una especificidad más elevada hacia la fibrina insoluble que el anticuerpo 102-10.

Por consiguiente, la detección *in vitro* e *in vivo* de la fibrina insoluble (trombo), el diagnóstico de una enfermedad relacionada con trombo, la visualización de un trombo (por ejemplo, PET/CT), demostrados en los ejemplos de referencia que se han descrito anteriormente también se pueden llevar a cabo, por supuesto, usando cualquiera de los anticuerpos anti-cadena β y los anticuerpos anti-cadena γ de la presente divulgación. Además, la administración de un compuesto antitumoral o similar a un sitio de trombo desvelado por los presentes inventores en PTL 7 también se puede llevar a cabo, puesto, usando cualquiera de los anticuerpos anti-cadena β y los anticuerpos anti-cadena γ
55 de la presente divulgación.

(Ejemplo 3)

Las secuencias de las regiones variables y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada uno del anticuerpo (anticuerpo Fib-0355) producido por el Fib-0355 y el anticuerpo (anticuerpo 34-105) producido por el
60 34-105 se determinaron con el método que se muestra a continuación.

En primer lugar, el ARN total se extrajo a partir de 1×10^6 células de cada hibridoma usando ARN iso Plus (fabricado por TAKARA) y el Kit RNeasy Mini (fabricado por QIAGEN). El ADNc se sintetizó mediante una reacción de transcripción inversa usando el ARNm extraído como un molde y usando el Kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (fabricado por Applied Biosystems) y los cebadores aleatorios unidos. La PCR se realizó usando el

ADNc sintetizado como un molde y usando una mezcla de cebadores para clonar las regiones variables del anticuerpo. Nótese que la mezcla de cebadores usados era una mezcla de 17 tipos de cebador sentido en la posición 5' de la región variable de la cadena L kappa (V_k), 3 tipos de cebador inverso en la posición 3' de V_k , 19 tipos de cebador sentido en la posición 5' de la región variable de la cadena H (VH), y 3 tipos de cebador inverso en la posición 3' de VH a una cierta proporción. Además, en esta PCR, la polimerasa usada fue platino Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (fabricado por Invitrogen), y la solución tampón y similares usados eran los reactivos ha unidos.

A continuación, el producto de PCR obtenido se desarrolló mediante electroforesis en gel de agarosa, y las bandas que se supuso que correspondían a las regiones VH y VL dirigidas basándose en los tamaños se reportaron. Posteriormente, el ADNc se extrajo del gel usando el Kit de Extracción en Gel QIAQuick (fabricado por Qiagen). El ADNc extraído se insertó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy (fabricado por promega) mediante la clonación de TA, y se obtuvieron múltiples clones que contenían las secuencias diana. Como los hospedadores se usaron de JM109 y DH5 α *E. coli*. Los hospedadores JM109 y DH5 α de *E. coli* se cultivaron respectivamente durante aproximadamente 12 horas y aproximadamente 16 horas en medio de cultivo LB (que contenía 50 ug/ml de ampicilina) a la identificación sistemática de color azul-blanco a 37 °C, y a continuación se seleccionaron las colonias de color blanco. A continuación, el ADN de plásmido se extrajo a partir de las colonias de color blanco obtenidas usando el Kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por QIAGEN).

A continuación, múltiples clones que contenían regiones variables de anticuerpos se sometieron a secuenciación usando el Kit de Secuenciación de Ciclo BigDye Terminator v3.1 (fabricado por Applied Biosystems) y el Analizador Genético 3130xl de Applied Biosystems (fabricado por Applied Biosystems/Hitachi) para obtener secuencias candidatas de las regiones variables de anticuerpo diana.

A continuación, las secuencias candidatas obtenidas se sometieron a IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) de NCBI, y se clasificaron en secuencias de anticuerpo y secuencias obtenidas a partir de mieloma. Además, la información de la secuencia obtenida de las regiones variables se comparó con la información de la secuencia almacenada en la base de datos (IMGT: <http://www.imgt.org>) en la web para determinar las regiones CDR. Las Figs. 18 y 19 muestran los resultados obtenidos. Además, las secuencias de aminoácidos identificadas de ese modo de las regiones variables y las CDR del anticuerpo 34-105 y el anticuerpo Fib-0355 también se muestran en el Listado de Secuencias con las SEQ ID NOs que se muestran a continuación.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena L (cadena ligera) de los anticuerpos 34-105: SEQ ID NO: 3

Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de cadena L de los anticuerpos 34-105: SEQ ID NOs: 4 a 6

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena H (cadena pesada) de los anticuerpos 34-105: SEQ ID NO: 7

Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de cadena H de los anticuerpos 34-105: SEQ ID NOs: 8 a 10.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena L (cadena ligera) del anticuerpo Fib-0355: SEQ ID NO: 11

Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de cadena L del anticuerpo Fib-0355: SEQ ID NOs: 12 a 14

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena H (cadena pesada) del anticuerpo Fib-0355: SEQ ID NO: 15

Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de cadena H del anticuerpo Fib-0355: SEQ ID NOs: 16 a 18.

45

Aplicabilidad Industrial

Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con la presente divulgación, es posible proporcionar un anticuerpo que no se une a fibrinógeno y que tiene una afinidad elevada y una especificidad elevada hacia la fibrina insoluble. El uso de un anticuerpo de este tipo permite una detección de alta sensibilidad, fiable, y sencilla de la presencia de fibrina insoluble y un trombo, y, a su vez, permite el diagnóstico de una enfermedad relacionada con trombos. Además, el uso de un anticuerpo de este tipo permite la administración de un compuesto o molécula adecuados a un sitio en el que está presente un trombo, por ejemplo, a un tumor. Por consiguiente, la presente divulgación es útil en el campo de diagnóstico médico y en el campo de la medicina.

55

Texto sin Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 3

<223> región variable de cadena ligera (34-105)

60

SEQ ID NO: 4

<223> CDR1 de región ligera (34-105)

SEQ ID NO: 5

<223> CDR2 de cadena ligera (34-105)

SEQ ID NO: 6

65

<223> CDR3 de cadena ligera (34-105)

SEQ ID NO: 7

<223> región variable de cadena pesada (34-105)
 SEQ ID NO: 8
 <223> CDR1 de cadena pesada (34-105)
 SEQ ID NO: 9
 5 <223> CDR2 de cadena pesada (34-105)
 SEQ ID NO: 10
 <223> CDR3 de cadena pesada (34-105)
 SEQ ID NO: 11
 10 <223> región variable de cadena ligera (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 12
 <223> CDR1 de cadena ligera (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 13
 <223> CDR2 de cadena ligera (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 14
 15 <223> CDR3 de cadena ligera (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 15
 <223> región variable de cadena pesada (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 16
 <223> CDR1 de cadena pesada (Fib-0355)
 20 SEQ ID NO: 17
 <223> CDR2 de cadena pesada (Fib-0355)
 SEQ ID NO: 18 <223> CDR3 de cadena pesada (Fib-0355)

Listado de secuencias

25 <110> NATIONAL CANCER CENTER
 <120> ANTICUERPO CONTRA FIBRINA INSOLUBLE
 <130> IBPF14-505WO
 <150> JP2013/039625
 30 <151> 28-02-2013
 <160> 23
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu Cys Glu Glu Ile Ile Arg
 1 5 10 15

40 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 2

Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly Phe Gly His Leu Ser Pro
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 50 <222> (1)..(108)
 <223> Region Variable de Cadena Ligera (34-105)
 55 <400> 3

ES 2 673 583 T3

```

Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65      70      75      80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
      85      90      95
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys
      100      105

```

5 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(10)
 10 <223> CDR1 de Cadena Ligera (34-105)
 <400> 4

```

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr
1      5      10

```

15 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 20 <221> SITIO
 <222> (1)..(3)
 <223> CDR2 de Cadena Ligera (34-105)
 <400> 5

```

Leu Val Ser
1

```

30 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(8)
 35 <223> CDR3 de Cadena Ligera (34-105)
 <400> 6

```

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg
1      5

```

40 <210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 45 <222> (1)..(115)
 <223> Región Variable de Cadena Pesada (34-105)

ES 2 673 583 T3

<400> 7

```

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1      5      10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50      55      60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65      70      75      80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val
85      90
Arg Gly Gly Thr Ile Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100      105      110
Val Ser Ala
115

```

5 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 10 <221> SITIO
 <222> (1)..(8)
 <223> CDR1 de Cadena Pesada (34-105)
 <400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

15
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR2 de Cadena Pesada (34-105)
 25 <400> 9

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr
1 5

30 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 35 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 de Cadena Pesada (34-105)
 <400> 10

Val Arg Gly Gly Thr Ile Gly Ala Tyr
1 5

40 <210> 11
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 673 583 T3

5 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(98)
 <223> Región Variable de Cadena Ligera (Fib-0355)
 <400> 11

```

Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
1          5          10          15
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
20          25          30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35          40          45
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
50          55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu
65          70          75          80
Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe
85          90          95
Gly Gly
  
```

10 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 15 <222> (1)..(10)
 <223> CDR1 de Cadena Ligera (Fib-0355)
 <400> 12

```

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys
1          5          10
  
```

20 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(8)
 <223> CDR2 de Cadena Ligera (Fib-0355)
 <400> 13

```

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1          5
  
```

35 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(4)
 40 <223> CDR3 de Cadena Ligera (Fib-0355)
 <400> 14

```

Tyr Leu Ser Ser
1
  
```

45 <210> 15
 <211> 106
 <212> PRT

5 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(106)
 <223> Región Variable de Cadena Pesada (Fib-0355)
 <400> 15

```

Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
1      5      10
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln
      20      25      30
Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr
      35      40      45
Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser
50      55      60
Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys
65      70      75
Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Leu Asp Tyr Trp
      85      90      95
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
      100      105
  
```

10 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 15 <221> SITIO
 <222> (1)..(7)
 <223> CDR1 de Cadena Pesada (Fib-0355)
 <400> 16

```

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
1      5
  
```

20
 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(6)
 <223> CDR2 de Cadena Pesada (Fib-0355)
 30 <400> 17

```

Asn Thr Asn Thr Gly Glu
  
```

```

1      5
  
```

35 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> SITIO
 40 <222> (1)..(5)
 <223> CDR3 de Cadena Pesada (Fib-0355)
 <400> 18

Arg Leu Leu Asp Tyr
1 5

5
<210> 19
<211> 491
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 19

Met	Lys	Arg	Met	Val	Ser	Trp	Ser	Phe	His	Lys	Leu	Lys	Thr	Met	Lys
1				5					10					15	
His	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Phe	Leu	Val	Lys	Ser	Gln	Gly
			20					25					30		
Val	Asn	Asp	Asn	Glu	Glu	Gly	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	His	Arg	Pro
		35					40					45			
Leu	Asp	Lys	Lys	Arg	Glu	Glu	Ala	Pro	Ser	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro
	50					55					60				
Pro	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Arg	Ala	Arg	Pro	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala
65					70					75					80
Thr	Gln	Lys	Lys	Val	Glu	Arg	Lys	Ala	Pro	Asp	Ala	Gly	Gly	Cys	Leu
				85					90					95	
His	Ala	Asp	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Leu	Cys	Pro	Thr	Gly	Cys	Gln	Leu
			100					105					110		
Gln	Glu	Ala	Leu	Leu	Gln	Gln	Glu	Arg	Pro	Ile	Arg	Asn	Ser	Val	Asp
		115					120					125			
Glu	Leu	Asn	Asn	Asn	Val	Glu	Ala	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser
	130					135					140				
Phe	Gln	Tyr	Met	Tyr	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Trp	Gln	Lys	Arg	Gln	Lys
145					150					155					160
Gln	Val	Lys	Asp	Asn	Glu	Asn	Val	Val	Asn	Glu	Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu
				165					170					175	
Glu	Lys	His	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Glu	Thr	Val	Asn	Ser	Asn	Ile	Pro
			180					185					190		
Thr	Asn	Leu	Arg	Val	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Ser	Lys
	195						200					205			
Ile	Gln	Lys	Leu	Glu	Ser	Asp	Val	Ser	Ala	Gln	Met	Glu	Tyr	Cys	Arg
	210					215					220				
Thr	Pro	Cys	Thr	Val	Ser	Cys	Asn	Ile	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Lys	Glu
225					230					235				240	
Cys	Glu	Glu	Ile	Ile	Arg	Lys	Gly	Gly	Glu	Thr	Ser	Glu	Met	Tyr	Leu
				245					250					255	
Ile	Gln	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Tyr	Arg	Val	Tyr	Cys	Asp	Met
			260					265					270		
Asn	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Trp	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Arg	Gln	Asp	Gly
	275						280					285			
Ser	Val	Asp	Phe	Gly	Arg	Lys	Trp	Asp	Pro	Tyr	Lys	Gln	Gly	Phe	Gly
	290					295					300				
Asn	Val	Ala	Thr	Asn	Thr	Asp	Gly	Lys	Asn	Tyr	Cys	Gly	Leu	Pro	Gly
305					310					315					320
Glu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Asp	Lys	Ile	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Met	Gly
				325					330					335	
Pro	Thr	Glu	Leu	Leu	Ile	Glu	Met	Glu	Asp	Trp	Lys	Gly	Asp	Lys	Val
			340					345					350		

ES 2 673 583 T3

Lys	Ala	His	Tyr	Gly	Gly	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Ala	Asn	Lys	Tyr
		355					360					365			
Gln	Ile	Ser	Val	Asn	Lys	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Met
	370					375					380				
Asp	Gly	Ala	Ser	Gln	Leu	Met	Gly	Glu	Asn	Arg	Thr	Met	Thr	Ile	His
385					390					395					400
Asn	Gly	Met	Phe	Phe	Ser	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asp	Asn	Asp	Gly	Trp	Leu
			405						410					415	
Thr	Ser	Asp	Pro	Arg	Lys	Gln	Cys	Ser	Lys	Glu	Asp	Gly	Gly	Gly	Trp
			420					425					430		
Trp	Tyr	Asn	Arg	Cys	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Asn	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Trp
		435					440					445			
Gly	Gly	Gln	Tyr	Thr	Trp	Asp	Met	Ala	Lys	His	Gly	Thr	Asp	Asp	Gly
	450					455					460				
Val	Val	Trp	Met	Asn	Trp	Lys	Gly	Ser	Trp	Tyr	Ser	Met	Arg	Lys	Met
465					470					475					480
Ser	Met	Lys	Ile	Arg	Pro	Phe	Phe	Pro	Gln	Gln					
				485					490						

<210> 20
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

5

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp
 20 25 30
 Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr
 35 40 45
 Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys
 50 55 60
 Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr
 65 70 75 80
 Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro
 85 90 95
 Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser
 100 105 110
 Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr
 115 120 125
 His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn
 130 135 140
 Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln
 145 150 155 160
 Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
 195 200 205
 Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
 210 215 220
 Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
 225 230 235 240
 Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
 245 250 255
 Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
 260 265 270
 Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
 275 280 285
 Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp

 305 310 315 320
 Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
 325 330 335
 Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
 340 345 350
 Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
 355 360 365
 His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
 370 375 380
 Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
 385 390 395 400
 Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
 405 410 415
 Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys
 420 425 430
 Gln Val Arg Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr
 435 440 445
 Pro Glu Asp Asp Leu
 450

ES 2 673 583 T3

<211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

5

Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Thr Ser
 20

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

10

Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu
 1 5 10

15

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

20

His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro Thr Asn
 1 5 10 15
 Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2.
- 5 2. Un método para producir un anticuerpo que se une a fibrina insoluble, que comprende la inmunización con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Fig. 1

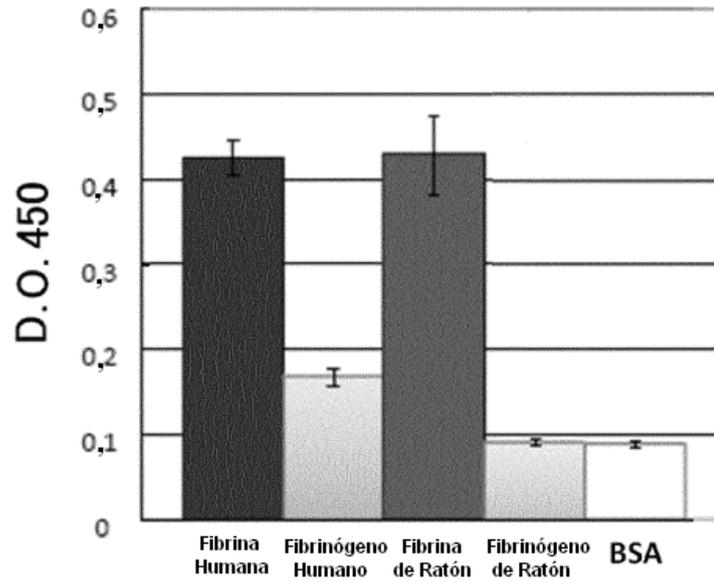


Fig. 2

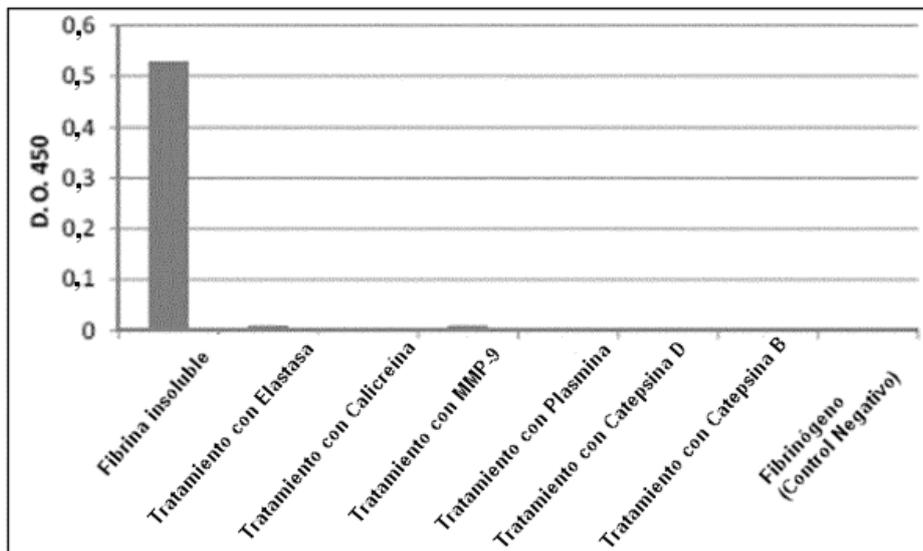


Fig. 3

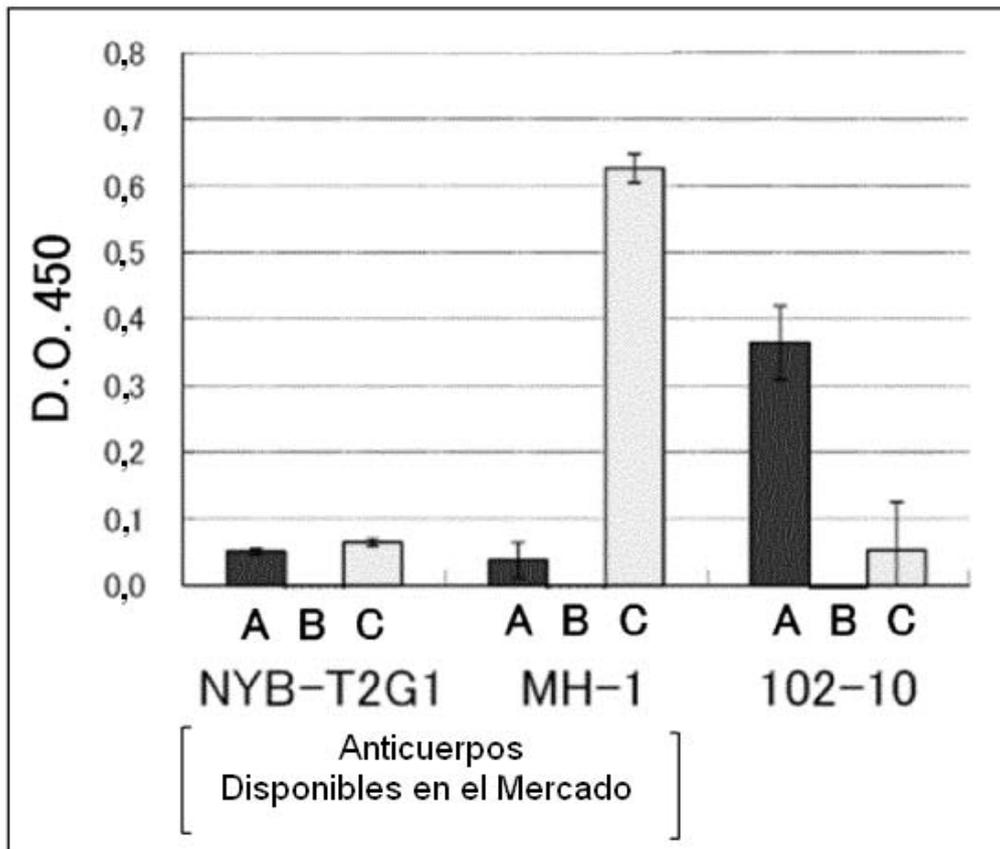


Fig. 4

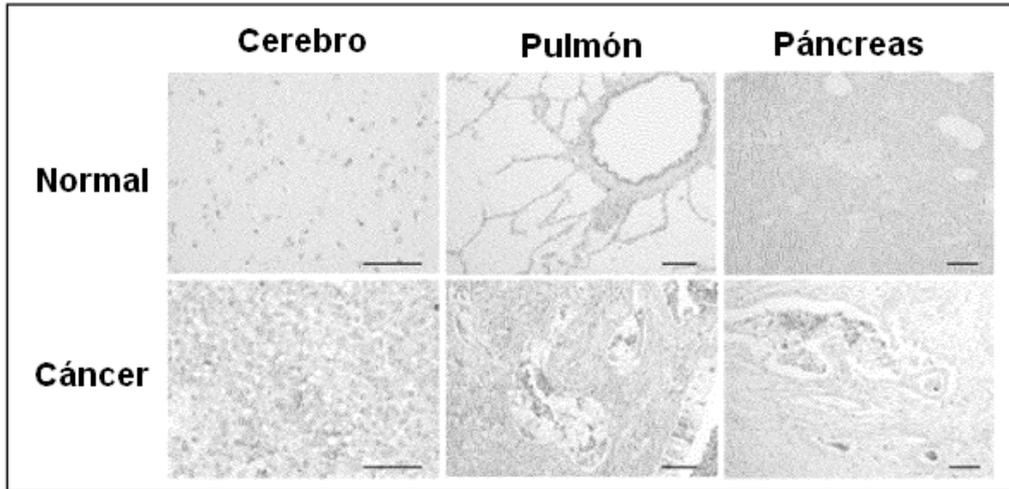


Fig. 5

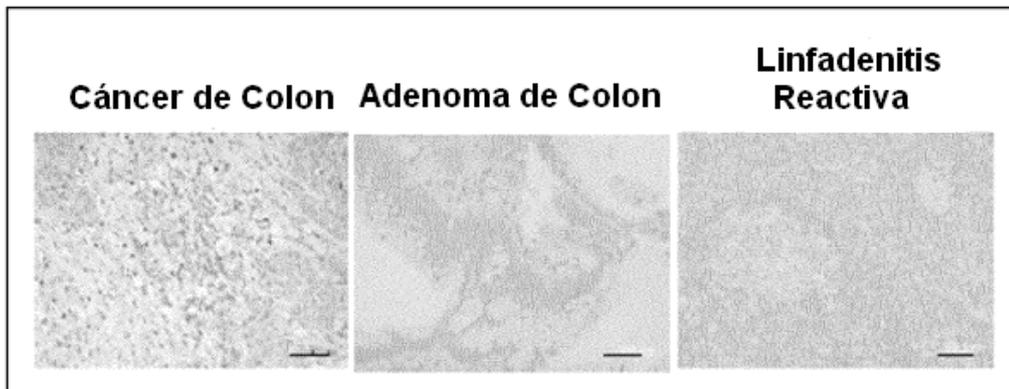


Fig. 6

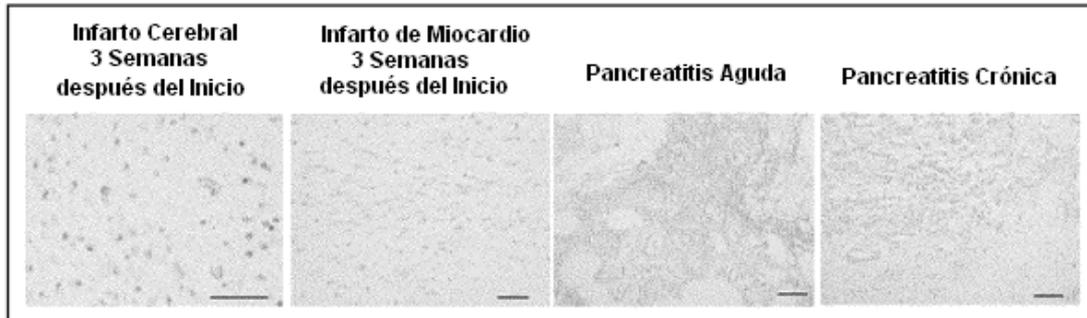


Fig. 7

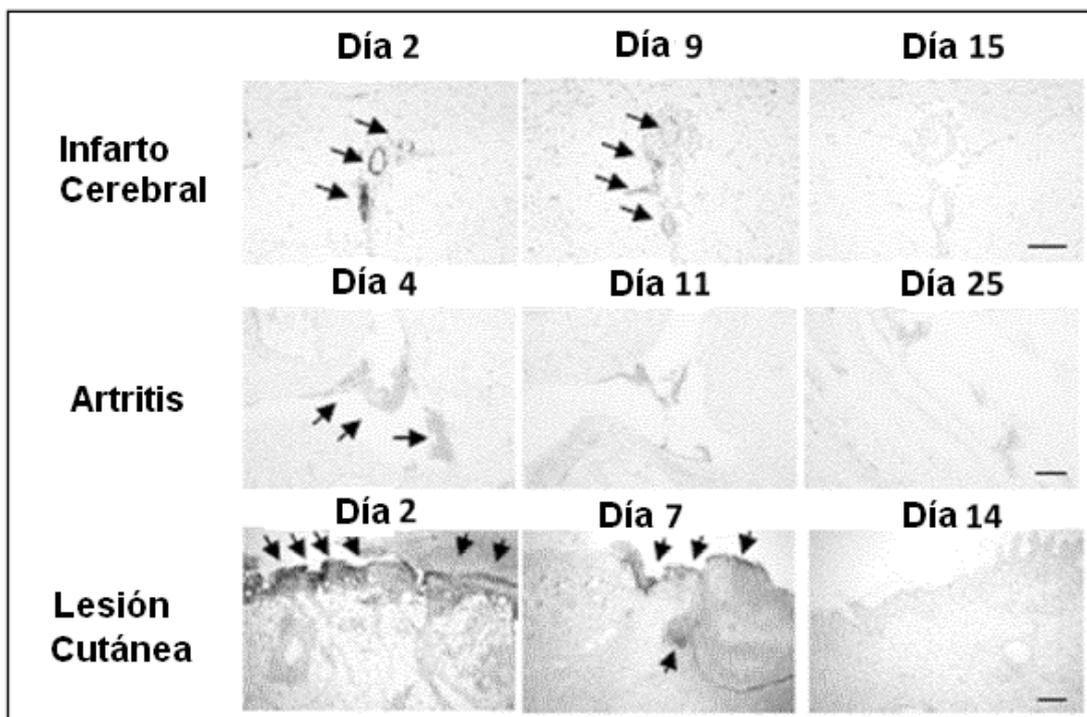


Fig. 8

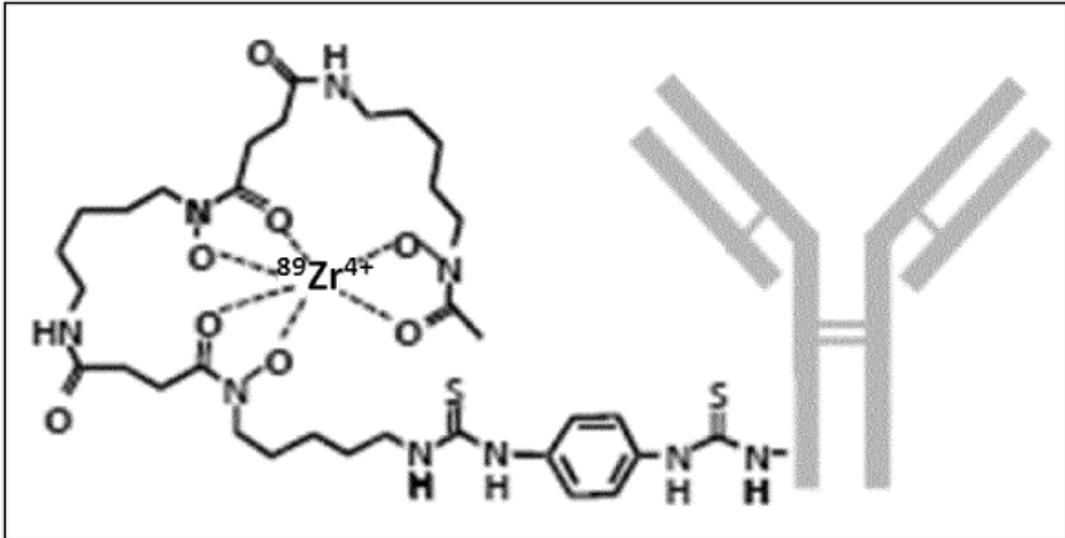


Fig. 9

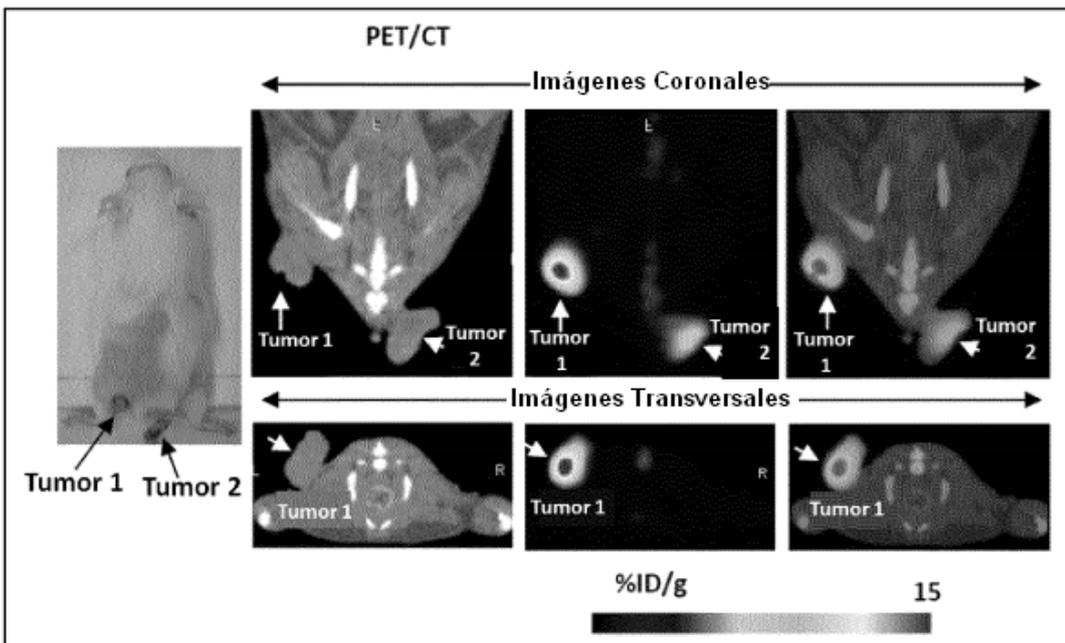


Fig. 10

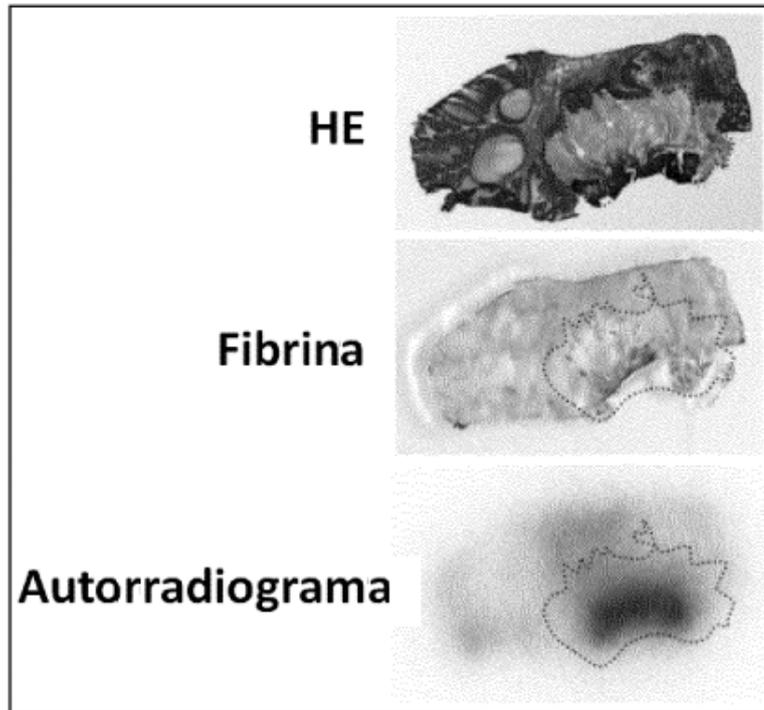


Fig. 11

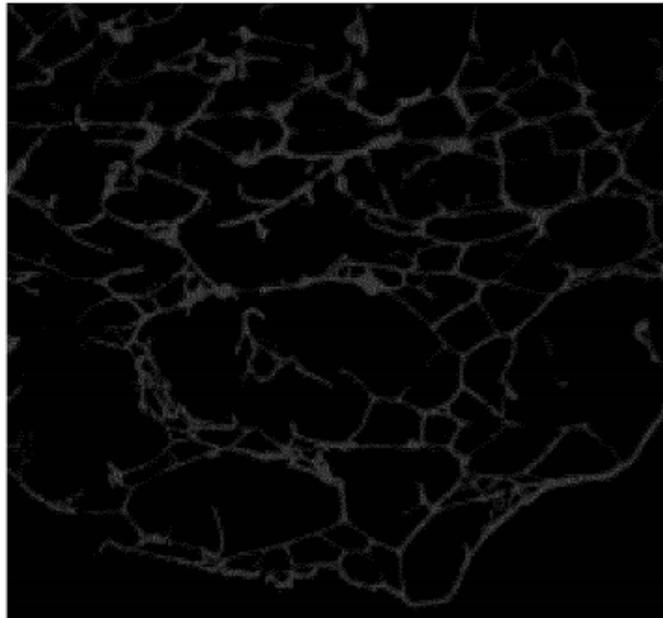


Fig. 12

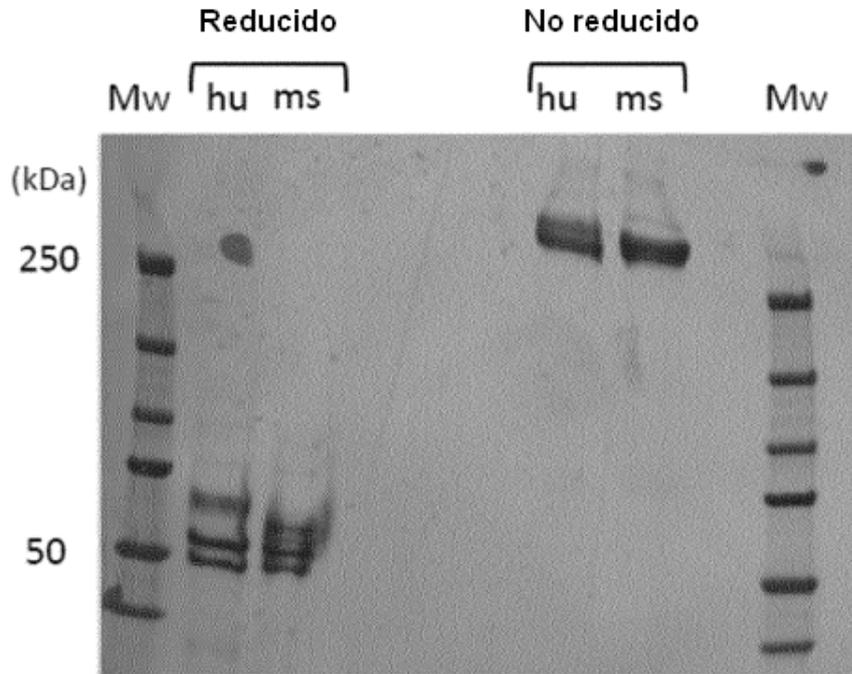


Fig. 13

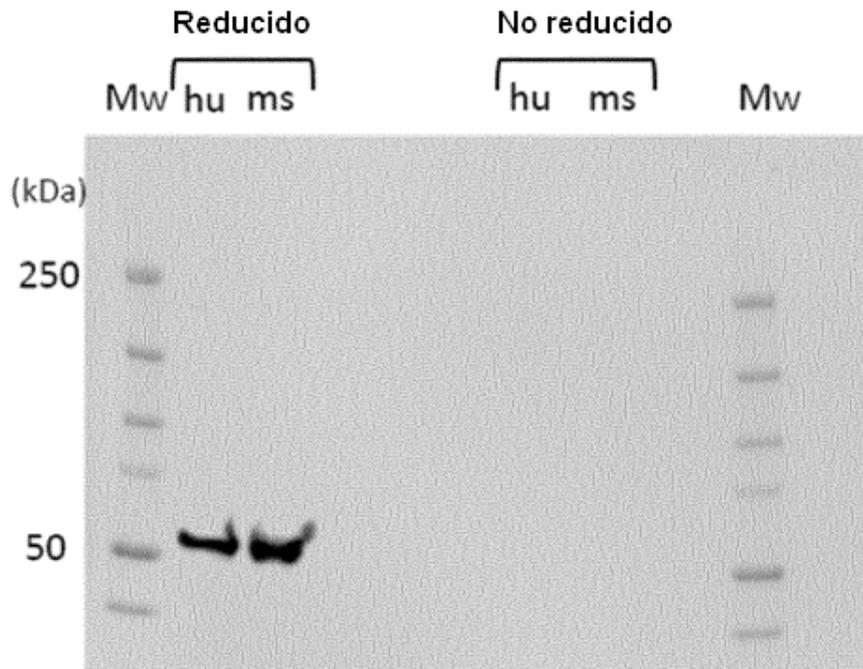


Fig. 14

mkrmvswsfh ktktmkhlll llcvflvks qgvndneegf fsarghrpld kkreeapslr
 pappisggg yrarpakaaa tqkkverkap daggclhadp dlglcptgc qlqeallqe
 rpirnsvdel nnnveavsqt ssssfqmyl lkdlwqkrqk qvkdnevvn eysselekq
 lyidetvnsn iptnlrvlrs ilenlrskiq klesdvsagm eycrtpctvs cnipvvsqke
 ceeiirkgge tsemyliqpd ssvkpyrvyc dmtenggwv viqnrqdgsv dfgrkwpyk
 qgfgnavatnt dgknycgllg eywlgndkis qltrmgptel liemedwkgd kvkahyggft
 vqneankyqi svnkrygtag nalmdgasql mgenrtmtih ngmffstyd r dndgwltsp
 rkqcskedgg gwwynrcha npngryywg qytwdmakhg tddgvvwmnw kgswymrkm
 smkirpffpq q

Fig. 15

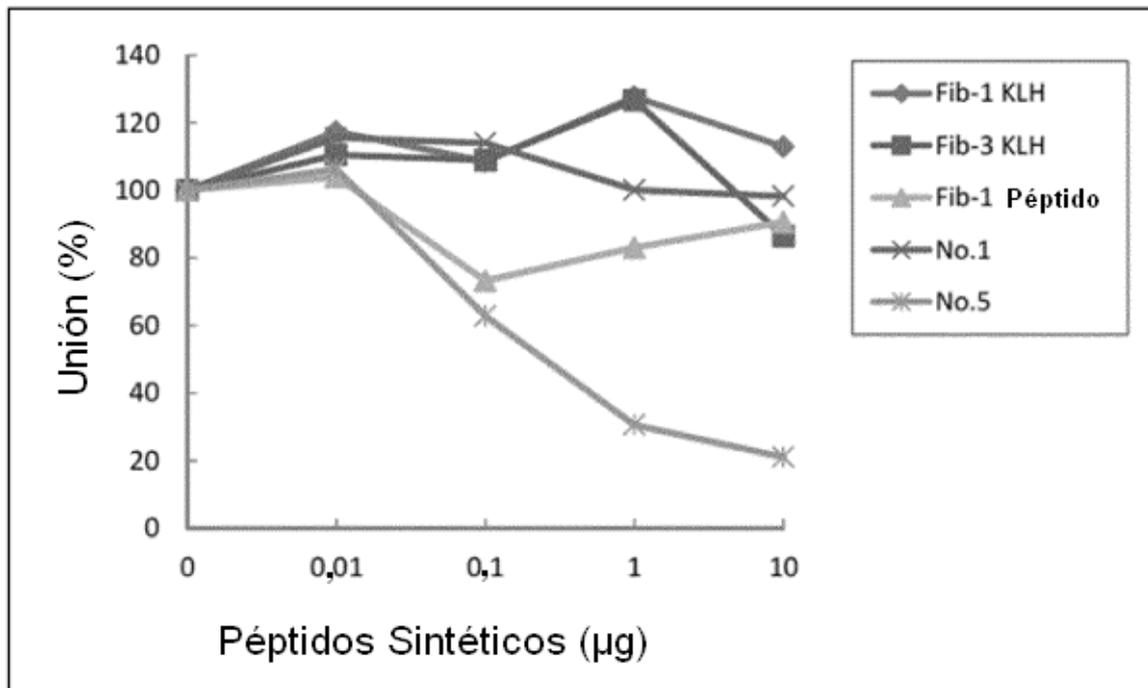


Fig. 16

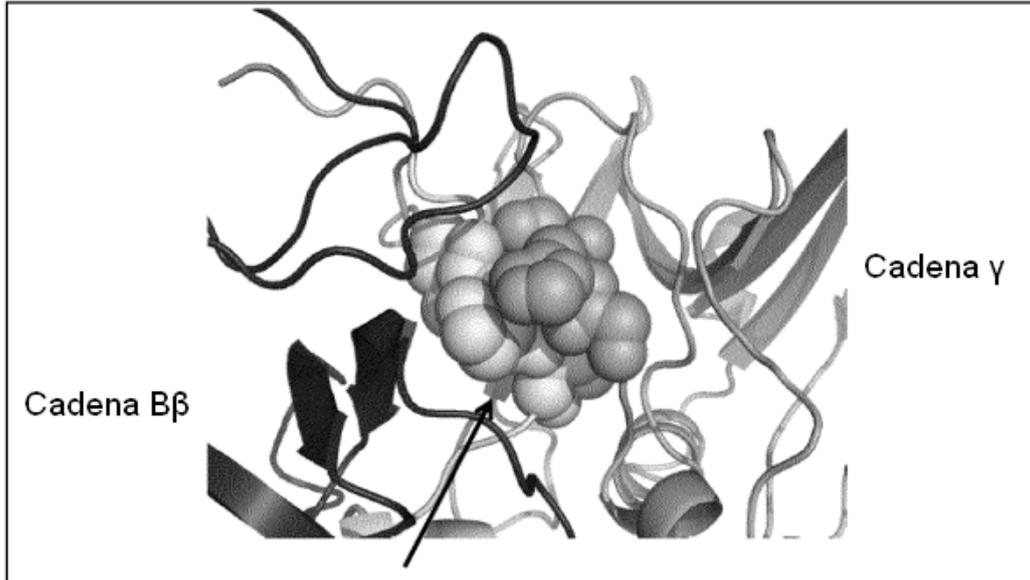


Fig. 17

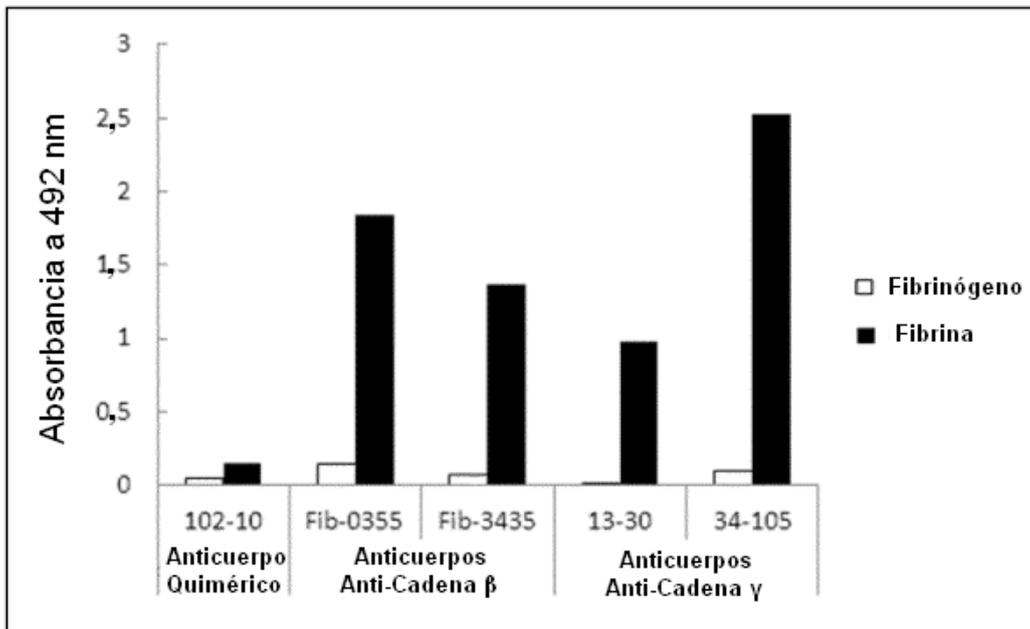


Fig. 18

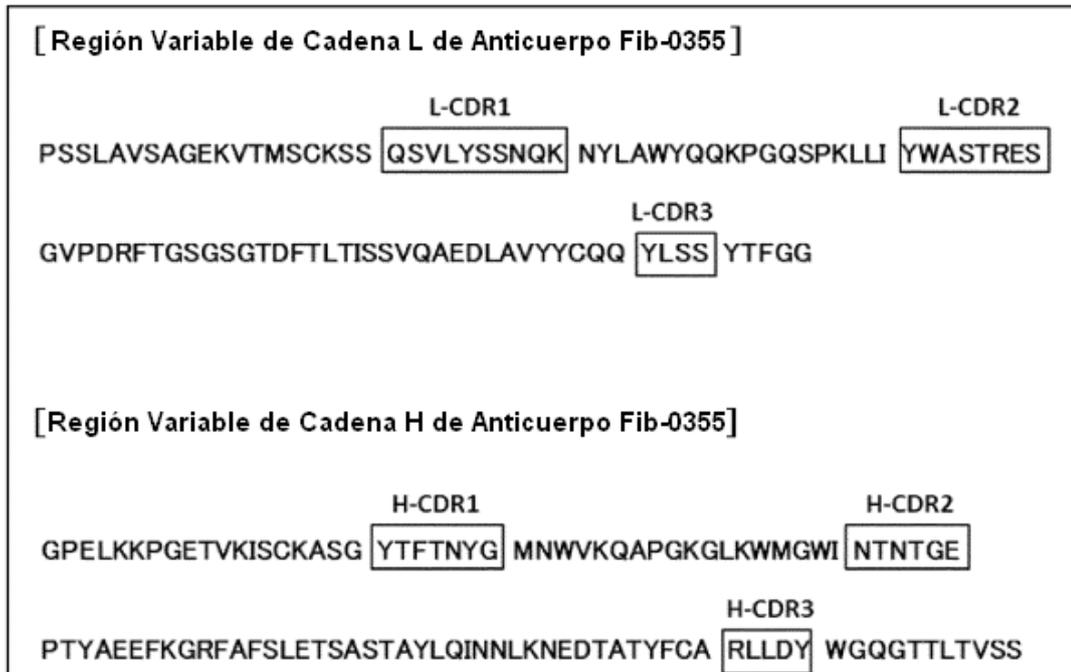


Fig. 19

