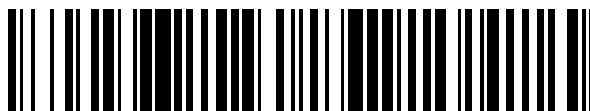


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 068**

51 Int. Cl.:
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03778577 .1**
96 Fecha de presentación: **01.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1570267**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **ENSAYO PARA IDENTIFICAR CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS.**

30 Prioridad:
03.12.2002 GB 0228188
20.08.2003 GB 0319587

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.02.2012

73 Titular/es:
UCB PHARMA, S.A.
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
BROWN, Derek Thomas;
BUTLER, Lisa;
CROMIE, Karen Dorothy;
GRIFFITHS, Meryn Ruth;
LAWSON, Alastair D. G. y
LIGHTWOOD, Daniel John

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 374 068 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

Ensayo para identificar células productoras de anticuerpos

- 5 La presente invención se refiere, en general, a procedimientos mejorados para producir anticuerpos y más específicamente proporciona un ensayo homogéneo para obtener anticuerpos.

10 El procedimiento de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM) para generar anticuerpos monoclonales supera las limitaciones tanto de la tecnología de hibridoma como de las colecciones de anticuerpos expresados bacteriamente permitiendo que se aislen los anticuerpos de alta afinidad generados durante respuestas inmunitarias in vivo de cualquier especie (Babcock et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 7843-7848). SLAM permite que se identifique un único linfocito que está produciendo un anticuerpo con una especificidad o función deseada dentro de una población grande de células linfoides y que se rescate la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo de ese linfocito. Las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se unen a antígenos seleccionados se detectan usando un procedimiento de ensayo de placas hemolíticas adaptadas (Jerne y Nordin, 1963, Science, 140, 405). En este ensayo, se recubren los eritrocitos con el antígeno seleccionado y se incuban con la población de células productoras de anticuerpos y una fuente de complemento. Se identifican las células productoras de anticuerpos individuales por la formación de placas hemolíticas. Se identifican las placas de eritrocitos lisados usando un microscopio invertido y se retiran las células productoras de anticuerpos individuales de interés en el centro de la placa usando técnicas de micromanipulación y se clonan los genes de anticuerpos de la célula por PCR de transcripción inversa. Otros procedimientos para detectar células productoras de anticuerpos individuales de una función deseada ya se han descrito en la especificación de patente internacional WO 92/02551.

25 El documento EP0286405 describe un procedimiento de fase homogénea de selección de células que produce un anticuerpo antiidiotípico que comprende poner en contacto una población de células productoras de anticuerpos con un anticuerpo marcado fluorescentemente producido por inmunización de un huésped con un antígeno de un patógeno seleccionado y seleccionar las células productoras de anticuerpos que se unen al antisuero marcado.

30 En el ensayo de placas hemolíticas descrito anteriormente, los glóbulos rojos se recubren normalmente con antígeno por medio de un sistema de acoplamiento de biotina/estreptavidina que requiere que se biotinile el antígeno. Por lo tanto, este procedimiento está restringido a los antígenos que están disponibles en una forma pura y a los que se pueden biotinar sin afectar a la presentación de epítopos. Este procedimiento evita claramente el aislamiento de anticuerpos frente a un amplio rango de antígenos. Por ejemplo, muchas proteínas son difíciles de purificar, en particular las proteínas expresadas en la superficie celular, tales como las proteínas de tipo III. Muchas proteínas alteran su conformación y presentación de epítopos deseables después de la biotilación, por ejemplo, las proteínas que contienen grupos lisina en su sitio activo.

40 También puede ser deseable producir anticuerpos frente a antígenos desconocidos, tales como las proteínas expresadas sobre la superficie de células, tales como células de tumor. El uso directo de células de tumor en el ensayo de placas en lugar de eritrocitos recubiertos con antígeno es difícil de lograr dado el requisito de que se produzca lisis celular para que se identifiquen las placas que contienen células productoras de anticuerpos. La lisis celular es dependiente del tipo de célula, la concentración de antígeno y de anticuerpo. Los glóbulos rojos recubiertos con el antígeno deseado se unirán a cantidades grandes de anticuerpos disponibles y se lisarán fácilmente en presencia de complemento. Otros tipos de células tales como células de tumor no se lisarán tan fácilmente, especialmente cuando la disponibilidad de antígeno sobre la superficie puede ser muy baja y por tanto, la unión a anticuerpo será baja.

50 Manz et al. (PNAS, 92, 1921-1925) dan a conocer un procedimiento para la identificación de células que segregan anticuerpos en las que el producto segregado se retiene sobre la superficie celular de las células analizadas. Las etapas requeridas incluyen la marcación de la superficie de la célula productora de anticuerpos con anticuerpos o antígenos de captura, la elevación artificialmente de la viscosidad del medio para detener la difusión y la alimentación cruzada del producto segregado entre células, etapas de lavado, identificación de células por procedimientos de clasificación de células activadas fluorescentes.

55 La presente invención trata estas dificultades por la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas. Este ensayo mejorado tiene muchas ventajas sobre los procedimientos descritos anteriormente, permitiendo la identificación de anticuerpos que se unen a cualquier antígeno, incluyendo antígenos desconocidos, antígenos de superficie celular y antígenos que no se pueden biotinar sin alterar la presentación de epítopos deseables. Como resultado, ahora se pueden producir anticuerpos con especificidades de unión que se identificaron previamente por ensayos de placas convencionales. Además, el ensayo es más simple que el ensayo de placas hemolíticas y las células productoras de anticuerpos se pueden identificar más rápidamente.

65 Los autores de la presente invención han demostrado que es posible obtener células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se unen a un antígeno incubando una población de células productoras de anticuerpos con una fuente de antígeno en presencia de anticuerpos marcados que se unen a los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos. Sorprendentemente, es posible distinguir las células que

producen anticuerpos que se unen a un antígeno de las que no lo hacen sin la necesidad de etapas de lavado para retirar el marcador no unido.

5 Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un ensayo homogéneo in vitro para identificar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado que comprende:

- a) proporcionar una población de células productoras de anticuerpos;
- b) incubar sobre un portaobjetos de microscopio dicha población de células productoras de anticuerpos con un antígeno seleccionado conjugado con una perla o acoplado a un eritrocito, o
10 antígeno expresado sobre la superficie de un célula, y un anticuerpo anti-anticuerpo marcado, en el que dicho anticuerpo anti-anticuerpo puede distinguir células que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen y en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado se marca con un conjugado fluorescente; y
- c) sin necesidad de retirar anticuerpos anti-anticuerpo marcados no unidos, identificar una célula productora de anticuerpos capaz de producir un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado detectando el incremento en la
15 concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean la célula usando un microscopio.

20 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye cualquier molécula de inmunoglobulina recombinante o que se produce de forma natural como un miembro de la clase de IgG, por ejemplo, IgG1, y también cualquier fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno, tal como fragmentos Fv, Fab' y F(ab')₂, y cualquier derivado del mismo, tal como fragmentos Fv monocatenarios.

25 El término "célula productora de anticuerpos", como se usa en el presente documento, significa cualquier célula que puede segregar un anticuerpo, tal como un linfocito B, una célula plasmática, un plasmablasto, un linfocito B activado o un linfocito B de memoria. Se pueden obtener células productoras de anticuerpos para el uso en la invención a partir de un animal que se ha inmunizado con un antígeno o bien que ha desarrollado una respuesta inmunitaria para un antígeno como resultado de una enfermedad. Otras células productoras de anticuerpos para el uso en la presente invención pueden incluir cualquier célula transformada, en particular, cualquier célula de mamífero que exprese genes de inmunoglobulina o partes de los mismos. En un ejemplo, las poblaciones de células
30 productoras de anticuerpos para el uso en la presente invención producen un rango de anticuerpos con diferentes especificidades de unión.

35 El ensayo de la presente invención también se puede usar para identificar células productoras de anticuerpos de alto rendimiento a partir de una población de células productoras de anticuerpos que producen todas el mismo anticuerpo. El término "alto rendimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos de una especificidad conocida pero para lo cual, sería deseable identificar lo más eficazmente posible las células que producen el anticuerpo. La identificación de la célula de alto rendimiento permitirá que se aisle la célula y que se reproduzca de forma clonal. En un ejemplo, la célula productora de anticuerpos de alto rendimiento es una célula de hibridoma. En otro ejemplo, la célula productora de anticuerpos de
40 alto rendimiento es una célula transformada, en particular, una célula de mamífero que expresa genes de inmunoglobulina o partes de los mismos. Los ejemplos de estas células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células NS0, CHO, COS y 293.

45 El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia conocida o desconocida que puede ser reconocida por un anticuerpo, incluyendo proteínas, glicoproteínas y carbohidratos. Preferentemente, estos antígenos incluyen proteínas biológicamente activas, tales como hormonas, citocinas y sus receptores de superficie celular, membranas celulares bacterianas o de parásitos o componentes purificados de los mismos, y antígenos víricos. En un ejemplo, el antígeno está disponible en una forma pura obtenida por purificación directa a partir de la fuente nativa o bien por expresión recombinante y purificación de dicho antígeno.
50 Preferentemente, el antígeno purificado se acopla a eritrocitos o a cualquier otra partícula tal como una perla para su incorporación al ensayo. En otro ejemplo, el antígeno es uno que es difícil de purificar, estos antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas expresadas en la superficie celular tales como receptores, en particular, proteínas de tipo III. En otro ejemplo, la presentación de epítopos deseables en el antígeno se altera después de la biotinylación, esto incluye, pero no se limita a, proteínas que contienen lisinas en sus regiones de sitio activas. En otro ejemplo, el antígeno se puede expresar sobre la superficie de una célula, de forma natural o bien recombinante. Tales células pueden incluir, pero no se limitan a, células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, linfocitos T, células de tumor, células de levadura, célula bacteriana, agentes contagiosos, parásitos, células de planta, células transfectadas tales como células NS0, CHO, COS, 293. En un ejemplo, los antígenos expresados en la superficie de estas células son antígenos que son difíciles de purificar o antígenos que pierden
60 epítopos deseados después de la biotinylación, tales como los antígenos descritos anteriormente.

En otro ejemplo, el antígeno es una célula o una población de células para la que sería deseable aislar anticuerpos, tales como células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, linfocitos T, células de tumor, células de levadura, célula bacteriana, agentes contagiosos, parásitos y células de planta. En una
65 realización, la célula es una célula de tumor.

5 El término "ensayo homogéneo", como se usa en el presente documento, se refiere a un ensayo por el que todos los componentes del ensayo se combinan juntos para identificar células productoras de anticuerpos sin la necesidad de retirar anticuerpos anti-anticuerpo marcados no unidos. El término "anticuerpo anti-anticuerpo marcado" se refiere a anticuerpos marcados que se unen a cualquier región de los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos, independientemente de la especificidad de unión de esos anticuerpos. Preferentemente, estos anticuerpos anti-anticuerpo son de una especie mientras las células productoras de anticuerpos son de otra. Preferentemente, estos anticuerpos se unen a la porción Fc del anticuerpo producido por la célula productora de anticuerpos.

10 Los anticuerpos anti-anticuerpo marcados pueden distinguir las células que producen anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen. Los marcadores apropiados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, marcadores de quimioluminiscencia, enzima y fluorescentes. Preferentemente, el marcador es un marcador fluorescente. El marcador fluorescente conjugado con los anticuerpos anti-anticuerpo puede ser cualquier marcador fluorescente incluyendo, pero sin limitarse a, Aqua, Texas-Red, FITC, rodamina, derivado de rodamina, fluoresceína, derivado de fluoresceína, cascade blue, Cy5 y ficoeritrina. Preferentemente, el conjugado fluorescente es FITC. Por lo tanto, en un ejemplo particular de un ensayo de acuerdo con la presente invención, las células productoras de anticuerpos son de ratones y los anticuerpos anti-anticuerpo marcados son anticuerpos anti-Fc anti-conejo de cabra marcados fluorescentemente.

20 En el ensayo de la presente invención, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado se distinguen de las que no lo hacen detectando el incremento en la concentración de los anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean estas células. Esto se logra visualizando los anticuerpos anti-anticuerpo marcados y de este modo la célula productora de anticuerpos rodeada por estos anticuerpos. Esto se logra usando un microscopio. Preferentemente, la etiqueta se detecta usando un microscopio invertido con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtros para el conjugado usado. Preferentemente, el conjunto de filtros es un conjunto de filtros de fluoresceína. Por lo tanto, cuando el marcador es un marcador fluorescente las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado se identifican por un incremento localizado en la fluorescencia que rodea a dichas células.

30 La presente invención también proporciona un procedimiento in vitro para producir un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado que comprende:

- 35 a) proporcionar una población de células productoras de anticuerpos;
- b) incubar sobre un portaobjetos de microscopio dicha población de células productoras de anticuerpos con un antígeno seleccionado conjugado con una perla o acoplado a un eritrocito, o un anticuerpo expresado sobre la superficie de un célula, y un anticuerpo anti-anticuerpo marcado, en el que dicho anticuerpo anti-anticuerpo puede distinguir células que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen y en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado se marca con un conjugado fluorescente;
- 40 c) sin necesidad de etapas de lavado, identificar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado detectando el incremento en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean la célula usando un microscopio;
- d) aislar la célula productora de anticuerpos identificada; y
- 45 e) sintetizar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la misma.

Cuando se desee, las etapas (d) y (e) se pueden repetir más de una vez para aislar más de una célula productora de anticuerpos y para sintetizar más de un anticuerpo.

50 Las células productoras de anticuerpos identificadas usando el ensayo homogéneo descrito en el presente documento se aíslan directamente del ensayo usando técnicas de micromanipulación bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos se pueden sintetizar a partir de la célula productora de anticuerpos aislada directa o bien indirectamente. La síntesis directa se puede lograr cultivando la célula productora de anticuerpos aislada en un medio apropiado. La síntesis indirecta se puede lograr aislando los genes que codifican los anticuerpos o partes de los mismos y expresándolos en una célula huésped usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Un vector que contiene el/los gen(es) de anticuerpo se transfecta en una células huésped y la célula huésped se cultiva en un medio apropiado de modo que se produzca el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con la especificidad deseada en la célula huésped.

60 Descripción detallada del ensayo

Se pueden obtener células productoras de anticuerpos para el uso en la presente invención a partir de cualquier fuente apropiada, incluyendo un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado o bien que ha desarrollado una respuesta inmunitaria para un antígeno como resultado de una enfermedad.

65 Los animales se pueden inmunizar con un antígeno seleccionado usando cualquiera de las técnicas bien conocidas

en la técnica para generar una respuesta inmunitaria (véase, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como seres humanos, conejos, ratones, ratas, oveja, vacas o cerdos para obtener células productoras de anticuerpos. Sin embargo, en general, se prefieren ratones, conejos y ratas.

5 Se pueden encontrar altos números de células productoras de anticuerpos en el bazo y los ganglios linfáticos del animal inmunizado y una vez se ha generado la respuesta inmunitaria y se ha sacrificado el animal, se retiran el bazo y los ganglios linfáticos. Se prepara una única suspensión celular de células productoras de anticuerpos usando técnicas bien conocidas en la técnica. También se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de un animal que ha generado las células durante el transcurso de una enfermedad. Por ejemplo, se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de un ser humano con una enfermedad de causa desconocida tal como cáncer, y se pueden usar para ayudar en la identificación de anticuerpos que tienen un efecto sobre el proceso de la enfermedad o que pueden conducir a la identificación de un agente o componente corporal que esté implicado en la causa de la enfermedad. De forma similar, se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de sujetos con enfermedad de causa conocida tal como malaria o SIDA. Estas células productoras de anticuerpos se pueden derivar de sangre o ganglios linfáticos, así como de otros tejidos enfermos o normales.

20 También se pueden obtener células productoras de anticuerpos por técnicas de cultivo, tales como inmunización in vitro. Los ejemplos de estos procedimientos se describen por C. R. Reading in Methods in Enzymology 121:18-33 (J. J. Langone, H. H. van Vunakis (eds.), Academic Press Inc., N. Y.). También se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de cultivos de adhesión monoclonales u oligoclonales muy tempranos producidos por tecnología de hibridoma convencional.

25 La población de células productoras de anticuerpos se puede enriquecer para el uso en el ensayo por procedimientos basados en el tamaño o en la densidad de las células productoras de anticuerpos con relación a otras células. Un ejemplo del uso de Percoll para separar células según la densidad se describe por van Mourik y W. P. Zeizlmaier en Methods in Enzymology 121:174-182 (J. J. Langone, H. H. van Vunakis (eds.), Academic Press Inc., N.Y.). También se pueden usar gradientes de densidad variable de soluciones de albúmina de suero bovina para separar células según la densidad. (Véase, N. Moav y T. N. Harris, J. Immunol. 105, 1512, 1970; véase también 30 Raid, D. J. en Selected Methods in Cellular Immunology, B. Misheli y S. Shiigi (eds.), W. H. Freeman y Co., San Francisco, 1987). Preferentemente, la separación se logra por centrifugación con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se puede determinar la fracción que está más enriquecida de células productoras de anticuerpos en un procedimiento preliminar usando ensayos basados en ELISA para seleccionar poblaciones que pueden contener anticuerpos con la especificidad de unión deseada. De forma alternativa o además, se puede determinar la 35 fracción más enriquecida para el anticuerpo deseado por un ensayo funcional.

40 En el ensayo, se suspende la población de células productoras de anticuerpos que se sospecha que produce anticuerpos con la especificidad de unión deseada en un medio apropiado antes de su incorporación en el ensayo. Un medio apropiado para el ensayo será uno que proporcione al menos los requisitos mínimos para el mantenimiento a corto plazo de la integridad celular y las estructuras celulares, tal como un tampón isotónico. Preferentemente, este medio celular inmunitario que comprende medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + 10 % de suero fetal bovino; 2-β-mercaptoetanol 50 μM; glutamina 2 mM; Hepes 20 mM; y 1x penicilina y estreptomina.

45 Bajo estas condiciones, las células productoras de anticuerpos producen y segregan anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se diluyen dentro del medio hasta una densidad que permite la selección de un número individual o pequeño de células productoras de anticuerpos. No queda claro qué célula es responsable de la actividad indicada por el ensayo, o para confirmar la actividad, la(s) célula(s) seleccionada(s) se pueden volver a someter a prueba para determinar su capacidad para producir anticuerpos con la especificidad de unión deseada.

50 El antígeno para el uso en el ensayo puede ser, como se describe anteriormente, cualquier sustancia para la que se puede producir un anticuerpo incluyendo proteínas, glicoproteínas, carbohidratos y células enteras, tales como células de tumor o células transfectadas que expresan el antígeno sobre la superficie. En un ejemplo, el antígeno es conocido y está disponible en una forma pura y se recubre sobre la superficie de eritrocitos u otras partículas tales como perlas para su incorporación en el ensayo. Los expertos en la técnica conocen varios procedimientos para recubrir partículas con antígenos. Estos incluyen cloruro crómico o carbodiimida soluble en agua. En una realización, se usa un sistema de acoplamiento de biotina/estreptavidina para acoplar antígeno a eritrocitos, para el que se describen procedimientos en detalle en el documento WO92/02551.

60 En otro ejemplo, se acopla el antígeno a perlas disponibles comercialmente (por ejemplo, las que se pueden obtener de New England Biolabs). Se puede conjugar el antígeno a las perlas usando varios procedimientos diferentes, preferentemente por medio de conjugación directa para perlas activadas o por medio de biotina para perlas acopladas a estreptavidina. Preferentemente, estas perlas son magnéticas para facilitar su manejo.

65 En otro ejemplo, en particular cuando el antígeno pierde epítopos deseables después de la biotilación, se acopla el antígeno a la superficie de una partícula por medio de un anticuerpo policlonal que se une al antígeno. Para preparar

el conjugado antígeno-anticuerpo policlonal-partícula, en primer lugar se conjuga el anticuerpo policlonal a la superficie de una partícula, tal como una perla usando cualquier procedimiento adecuado, tal como por medio de biotina para perlas acopladas a estreptavidina. Después, se incuba el conjugado anticuerpo policlonal-partícula con un exceso de antígeno para permitir la unión del anticuerpo policlonal al antígeno. Después, se separa el conjugado antígeno-anticuerpo policlonal-partícula del antígeno no unido, por ejemplo por centrifugación, y se incorpora en el ensayo. El anticuerpo policlonal para el uso en el conjugado se puede producir usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, usando el antígeno deseado como inmunógeno, en cualquier especie adecuada. El anticuerpo policlonal puede ser una IgG entera o un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab', F(ab')₂ o Fab. Los fragmentos se pueden producir usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo por digestión de pepsina o papaína. Es importante que el anticuerpo policlonal usado en el conjugado no sea reconocido por el anticuerpo anti-anticuerpo marcado usado en el ensayo para detectar los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos. Por ejemplo, cuando las células productoras de anticuerpos son de conejo, el anticuerpo anti-anticuerpo marcado puede ser un anticuerpo anti-Fc anti-conejo y el anticuerpo policlonal usado en el conjugado podría ser un anticuerpo de una especie diferente de conejo, por ejemplo cabra, o si el anticuerpo es de conejo podría ser un fragmento que carece de la región Fc, por ejemplo un fragmento Fab', F(ab')₂ o Fab.

En otro ejemplo, en particular cuando el antígeno es difícil de purificar o pierde epítomos deseados después de la biotilación, el antígeno se expresa sobre la superficie de una célula. Tales células pueden ser las que expresan de forma natural el antígeno sobre su superficie o una célula transfectada que expresa el antígeno sobre su superficie. Estas células pueden incluir, pero no se limitan a, células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, linfocitos T, células de tumor, células de levadura, célula bacteriana, agentes contagiosos, parásitos, células de planta, células transfectadas tales como células NS0, CHO, COS, 293. La transfección de células tales como células NS0, CHO, COS y 293 se puede lograr por cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo, electroporación y nucleofección.

En un ejemplo adicional, la fuente de antígenos es cualquier célula de la que sería deseable aislar anticuerpos. Estas células pueden incluir, pero no se limitan a, células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, linfocitos T, células de tumor, células de levadura, célula bacteriana, agentes contagiosos, parásitos y células de planta.

Las células productoras de anticuerpos y el antígeno se incorporan en el ensayo en una concentración apropiada que se puede determinar empíricamente, por ejemplo, como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento. Las células productoras de anticuerpos están a una densidad suficientemente baja como para que se separen bien permitiendo la identificación y el aislamiento de las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos de la especificidad deseada. El antígeno estará presente en exceso y preferentemente el antígeno está en un exceso de 10-1.000 veces sobre las células productoras de anticuerpos.

Para identificar los anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado, se incorporan al ensayo anticuerpos anti-anticuerpo marcados. Estos anticuerpos se unirán a todos los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos, independientemente de su especificidad de unión. Estos anticuerpos se producen fácilmente por un experto en la técnica o están fácilmente disponibles comercialmente. Preferentemente, los anticuerpos anti-anticuerpo son anticuerpos anti-Fc. En una realización de la presente invención, las células productoras de anticuerpos son de conejos y los anticuerpos anti-Fc marcados son anticuerpos anti-Fc anti-conejo de cabra.

El marcador conjugado con los anticuerpos anti-anticuerpo es cualquier marcador que se pueda detectar en el ensayo por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Están disponibles muchos conjugados diferentes para marcar los anticuerpos, por ejemplo, marcadores quimioluminiscentes, de enzima y fluorescentes. Estos anticuerpos se producen fácilmente por un experto en la técnica o están fácilmente disponibles comercialmente. Preferentemente, el marcador es uno que se pueda detectar por microscopía. En general, en los diversos aspectos de la invención descrita en el presente documento, el marcador usado es preferentemente un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes particulares son los que se pueden visualizar por microscopía y pueden incluir, pero sin limitarse a, Aqua, Texas-Red, FITC, rodamina, derivados de rodamina, fluoresceína, derivados de fluoresceína, cascade blue, Cy5 y ficoeritrina. Preferentemente, este marcador es el conjugado fluorescente, isotiocianato de fluoresceína (FITC).

El anticuerpo anti-anticuerpo marcado se usa en el ensayo en una concentración en la que es posible distinguir células que producen anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen. Se puede determinar la concentración óptima empíricamente por un experto en la técnica variando la concentración del anticuerpo anti-anticuerpo marcado. En un ejemplo, el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado fluorescente y se usa en una concentración que no es tan baja como para que no se pueda detectar la fluorescencia y no es tan alta como para que exista una alta fluorescencia de fondo. Preferentemente, el anticuerpo anti-anticuerpo marcado está en exceso de modo que se une a todos los anticuerpos producidos por la célula productora de anticuerpos sin provocar una fluorescencia de fondo excesiva.

Para identificar células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado, la mezcla de ensayo que comprende una población de células productoras de anticuerpos, el antígeno y el

5 anticuerpo anti-anticuerpo marcado se incuba en el medio descrito anteriormente para permitir que tenga lugar la unión. Los tiempos y temperaturas óptimas de incubación pueden ser determinados empíricamente por un experto en la técnica. La incubación tendrá lugar en cualquier recipiente adecuado tal como un portaobjetos de microscopio a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre 4 °C o aproximadamente y 37 °C o aproximadamente, para cualquier duración de tiempo adecuada, por ejemplo entre 5 minutos o aproximadamente y 5 horas o aproximadamente. Preferentemente, la incubación de la mezcla de ensayo tiene lugar sobre un portaobjetos de microscopio a 37 °C durante hasta 1 hora.

10 El anticuerpo anti-anticuerpo marcado se detecta usando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo anti-anticuerpo marcado se detecta usando microscopio. Más preferentemente, el anticuerpo anti-anticuerpo se conjuga con un marcador fluorescente y se visualiza la fluorescencia usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio con un juego de filtros apropiado. Preferentemente, el conjunto de filtros es un conjunto de filtros de fluoresceína.

15 Las células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado se identifican por el incremento en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean a la célula. Estas células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos que no se unen al antígeno no estarán rodeadas con un incremento en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados. Las células productoras de anticuerpos de alto rendimiento se identifican como aquellas en las que el incremento localizado en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo aparece más rápidamente.

Después, la célula productora de anticuerpos se puede aislar directamente del ensayo usando técnicas de micromanipulación estándar tales como una pipeta de vidrio fino y un micromanipulador.

25 Los anticuerpos se pueden sintetizar directa o indirectamente a partir de la célula productora de anticuerpos aislada. La síntesis directa se puede lograr cultivando la célula productora de anticuerpos aislada en un medio apropiado. Si el ensayo se usa para identificar una célula productora de anticuerpos de alto rendimiento, la célula se cultivará bajo condiciones apropiadas para reproducir de forma clonada esta célula de alto rendimiento.

30 La síntesis indirecta se puede lograr aislando los genes que codifican los anticuerpos o partes de los mismos y expresándolos en una célula huésped. Los genes enteros se pueden clonar o las regiones variables o porciones de las mismas que confieren la especificidad deseada del anticuerpo se pueden clonar y usar para producir anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes pueden tomar varias formas diferentes e incluir inmunoglobulinas intactas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígenos tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, y cualquier derivado de los mismos, tales como fragmentos Fv monocatenarios. Los procedimientos para crear estas moléculas de anticuerpo se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, Boss, documento US 4.816.397; Shrader, documento WO 92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al, 1988, Science, 242, 423). Los tipos de sistemas de expresión disponibles para producir estas moléculas de anticuerpo incluyen sistemas de expresión bacteriana, de levadura, de insecto y de mamífero, para los que se conocen procedimientos en la técnica (Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

45 Los anticuerpos obtenidos de acuerdo con la presente divulgación se pueden usar sin modificación adicional, o si se desea, después de modificación incluyendo conjugación de uno o más moléculas indicadoras o efectoras, para cualquier propósito diagnóstico o terapéutico.

Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1. Un ensayo de fluorescencia homogéneo que comprende linfocitos B de conejo, glóbulos rojos de oveja recubiertos con antígeno y conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra. Ensayo visualizado usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtro de fluoresceína. Aumento x8.

55 (a) Imagen de fase de ensayo.
(b) Imagen de fluorescencia de ensayo. Fluorescencia localizada alrededor de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno

60 Figura 2. Un ensayo de fluorescencia homogéneo que comprende linfocitos B de conejo, perlas magnéticas recubiertos con antígeno y conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra. Ensayo visualizado usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtro de fluoresceína. Aumento x20.

65 (a) Imagen de fase de ensayo.
(b) Imagen de fluorescencia de ensayo. Fluorescencia localizada alrededor de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno

Figura 3. Detección con ELISA de unión a antígeno específico de anticuerpos producidos en células CHO.

5 Figura 4. Un ensayo de fluorescencia homogéneo que comprende linfocitos B de conejo, células COS-1 transfectadas que expresan antígeno sobre su superficie y conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra. Ensayo visualizado usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtro de fluoresceína. Aumento x8.

10 (a) Imagen de fase de ensayo.
(b) Imagen de fluorescencia de ensayo. Fluorescencia localizada alrededor de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno.

15 Figura 5. Un ensayo de fluorescencia homogéneo que comprende linfocitos B de conejo, células CHO transfectadas que expresan antígeno sobre su superficie y conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra. Ensayo visualizado usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtro de fluoresceína. Aumento x8.

20 (a) Imagen de fase de ensayo.
(b) Imagen de fluorescencia de ensayo. Fluorescencia localizada alrededor de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Las siguientes abreviaturas se usan en los ejemplos:

25 ICM - medio celular inmunitario (RPMI +10 % de suero fetal bovino; 2-β-mercaptoetanol 50μM; glutamina 2mM; hepes 20mM; y 1x penicilina y estreptomycin)
RPMI - Medio de Roswell Park Memorial Institute
PBS - Solución salina tamponada con fosfato

30 **Ejemplo 1**

Identificación de linfocitos B productores de anticuerpos específicos usando glóbulos rojos de oveja (SRBC) recubiertos de antígeno

35 **Recubrimiento de antígeno de SRBC**

Se llevó a cabo el recubrimiento de los SRBC (obtenidos de TCS Biosciences) uniendo con estreptavidina el antígeno biotilado a la superficie de SRBC recubiertas con biotina. Se prepararon SRBC recubierta con antígeno el día de uso y se almacenó un 5 % (v/v) en medio celular inmunitario.

40 **Identificación de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno**

45 Se colocó la mezcla de ensayo en ICM y que contenía 10 μl de linfocito B de conejo B que contenían 10-1.000 linfocitos B de una población positiva de ELISA, 10 μl de SRBC recubierto de antígeno (5 % v/v) y 20 μl de conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch) en concentraciones variables para cada experimento (1:100, 1:200, 1:400 y 1:800). Se ajustaron los experimentos para determinar la concentración óptima de conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra requerida para la identificación de células productoras de anticuerpos sin fluorescencia de fondo excesiva.

50 Después se manchó esta mezcla de ensayo (2-3 μl por mancha), sobre un portaobjetos de "cámara" tratado Sigmacote® y se inundó con aceite de parafina ligera. Se incubaron los portaobjetos durante 20-30 min a 37 °C y se examinaron usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtros de fluoresceína. Se identificaron linfocitos B, (células plasmáticas), que segregaban anticuerpo IgG de antígeno por un incremento focal en la fluorescencia que rodeaba a dichas células. Véase la figura 1. Usando este procedimiento, se encontró que la concentración óptima para el conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra era 1:400. Otros linfocitos B en la mezcla, que no segregaron anticuerpos específicos de antígeno, no mostraron fluorescencia circundante. En los controles de SRBC en los que no estaba presente antígeno sobre la superficie, no se observó fluorescencia localizada de linfocitos B.

60 Después, se recogieron los linfocitos B presentes dentro de los focos fluorescentes en tubos de Eppendorf usando un aparato de micromanipulación estándar, (Eppendorf Transferman y CellTram Vario) y se aislaron posteriormente por PCR las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo.

Ejemplo 2

Identificación de linfocitos B productores de anticuerpo específico usando perlas recubiertas con antígeno

5 Se usaron perlas recubiertas con estreptavidina magnéticas 1 μ M, (New England Biolabs), en todos los experimentos.

Determinación de la densidad óptima para la monocapa de perlas.

10 Se lavó una alícuota de la reserva de perlas 3x en PBS para retirar el conservante, usando un imán, y se resuspendió en el mismo volumen de medio celular inmunitario, (ICM), (RPMI + 10 % de suero fetal bovino; 2- β -mercaptoetanol 50 μ M; glutamina 2 mM; Hepes 20 mM; y 1x Penicilina y estreptomycin).

15 Se prepararon diluciones de 2 veces en serie de perlas en ICM y se usaron para determinar una dilución con una densidad de perlas que produjera que produjo una monocapa uniforme cuando se mancharon las perlas (2-3 μ l por mancha) sobre un portaobjetos tratado de Sigmacote y se superpuso con aceite de parafina ligera. Se determinó que era óptima una dilución final de perlas lavadas de 1/8.

Carga de antígeno sobre perlas e identificación de linfocitos B específicos de antígeno.

20 Se lavaron alícuotas de 50 μ l de perlas recubiertas con estreptavidina y se resuspendieron en 50 μ l de PBS. Se incubó cada alícuota con diferentes cantidades de antígeno biotinilado de reserva (1 mg/ml) variando de desde 0,1 μ g hasta 25 μ g. Se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación manual ocasional. Después, se lavaron las perlas en PBS usando un imán y se resuspendieron en 50 μ l de ICM.

25 Después, se mezclaron 20 μ l de las perlas cargadas de antígeno con 40 μ l de linfocitos B positivos de ELISA; 60 μ l de ICM; y 40 μ l de una dilución 1/400 de un conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch).

30 Después, se manchó esta mezcla (2-3 μ l por mancha), sobre un portaobjetos de "cámara" tratado Sigmacote y se inundó con aceite de parafina ligera. Se incubaron los portaobjetos durante 20-30 min a 37 °C y se examinaron usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtros de fluoresceína.

35 Se identificaron linfocitos B, (células plasmáticas), que segregaban anticuerpo IgG de antígeno por un incremento focal en la fluorescencia alrededor de los linfocitos B. Véase la figura 2. Usando este procedimiento se determinó como óptimo 1 g de antígeno biotinilado por 50 μ l de reserva de perlas para la generación de señal para este antígeno particular. Otros linfocitos B en la mezcla, que no segregan anticuerpos específicos de antígeno, no mostraron fluorescencia circundante. En los controles, no se observó fluorescencia localizada de linfocitos B cuando se recubrieron las perlas con otro antígeno irrelevante.

45 Después, se recogieron los linfocitos B presentes dentro de los focos fluorescentes en tubos de Eppendorf usando un aparato de micromanipulación estándar, (Eppendorf Transferman y CellTram Vario) y se aislaron posteriormente por PCR las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de una de las células. Se produjo una IgG quimérica recombinante IgG (regiones constantes humanas) por expresión transitoria en células CHO. Se realizaron transfecciones de células CHO usando el procedimiento de lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (InVitrogen, núm. de catálogo 18324). Se confirmó la unión específica del antígeno de IgG por ELISA (figura 3).

50 Ejemplo 3

Identificación del linfocitos B productores de anticuerpos específicos usando expresión de superficie de antígeno sobre células COS-1

55 Expresión transitoria de antígeno sobre células COS-1

Se suspendieron células COS-1 que expresan de forma transitoria el antígeno seleccionado en medio celular inmunitario. Se alteró la densidad celular a 2×10^7 células por ml.

60 Identificación de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno

Se colocó la mezcla de ensayo en ICM y que contenía 40 μ l de linfocitos B positivos de ELISA, 40 μ l de conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:400 y 40 μ l de suspensión de células COS-1.

65 Después se manchó esta mezcla de ensayo (2-3 μ l por mancha), sobre un portaobjetos de "cámara" tratado

Sigmacote y se inundó con aceite de parafina ligera. Se incubaron los portaobjetos durante 40 min a 37 °C y se examinaron usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtros de fluoresceína.

5 Se identificaron linfocitos B, (células plasmáticas), que segregaban anticuerpo IgG de antígeno por un incremento focal en la fluorescencia que rodeaba los linfocitos B. Véase la figura 4. Otros linfocitos B en la mezcla, que no segregan anticuerpos específicos de antígeno, no mostraron fluorescencia circundante. En los controles de células COS-1 en los que no estaba presente antígeno sobre la superficie, no se observó fluorescencia localizada de linfocitos B.

10 Después, se recogieron los linfocitos B presentes dentro de los focos fluorescentes en tubos de Eppendorf usando un aparato de micromanipulación estándar, (Eppendorf Transferman y CellTram Vario) y se aislaron posteriormente por PCR las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo.

15 **Ejemplo 4**

Identificación del linfocitos B productores de anticuerpos específicos usando expresión de superficie de antígeno sobre células de ovario de hámster chino (CHO)

20 **Expresión transitoria de antígeno sobre células CHO**

Se suspendieron células CHO que expresan de forma transitoria el antígeno seleccionado en medio celular inmunitario. Se alteró la densidad celular a 2×10^7 células por ml.

25 **Identificación de linfocitos B que segregan anticuerpos específicos de antígeno**

Se colocó la mezcla de ensayo en ICM y que contenía 40 μ l de linfocitos B positivos de ELISA, 40 μ l de conjugado FITC específico de IgG Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:400 y 40 μ l de suspensión de células CHO.

30 Después se manchó esta mezcla de ensayo (2-3 μ l por mancha), sobre un portaobjetos de "cámara" tratado Sigmacote y se inundó con aceite de parafina ligera. Se incubaron los portaobjetos durante 40 min a 37 °C y se examinaron usando un microscopio invertido equipado con una lámpara de UV con vapor de mercurio y un conjunto de filtros de fluoresceína.

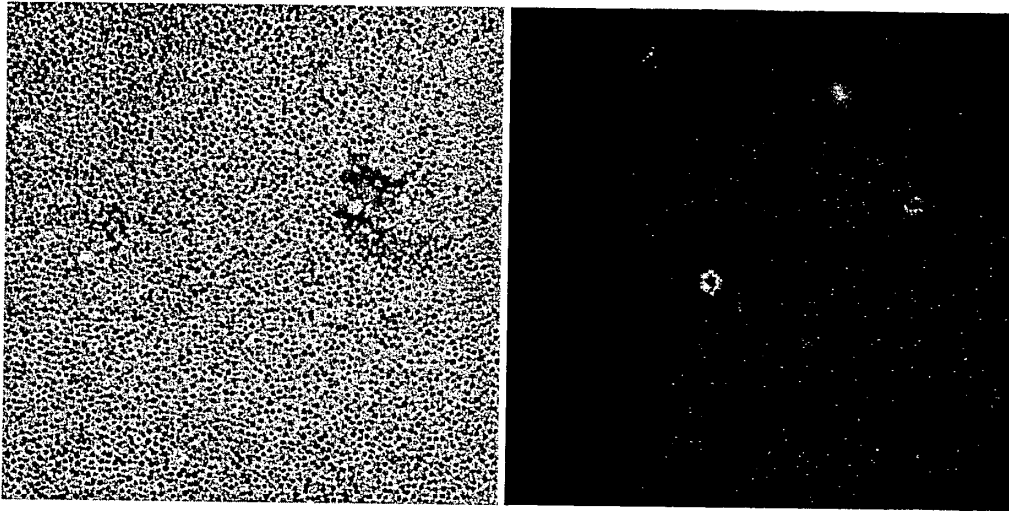
35 Se identificaron linfocitos B, (células plasmáticas), que segregaban anticuerpo IgG de antígeno por un incremento focal en la fluorescencia que rodeaba los linfocitos B. Véase la figura 5. Otros linfocitos B en la mezcla, que no segregan anticuerpos específicos de antígeno, no mostraron fluorescencia circundante. En los controles de células CHO en los que no estaba presente antígeno sobre la superficie, no se observó fluorescencia localizada de linfocitos B.

40 Después, se recogieron los linfocitos B presentes dentro de los focos fluorescentes en tubos de Eppendorf usando un aparato de micromanipulación estándar, (Eppendorf Transferman y CellTram Vario) y se aislaron posteriormente por PCR las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo.

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo homogéneo in vitro para identificar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado que comprende:
- 5 a) proporcionar una población de células productoras de anticuerpos;
b) incubar sobre un portaobjetos de microscopio dicha población de células productoras de anticuerpos con un antígeno seleccionado conjugado con una perla o acoplado a un eritrocito, o antígeno expresado sobre la superficie de un célula, y un anticuerpo anti-anticuerpo marcado, en el que dicho anticuerpo anti-anticuerpo puede distinguir células que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen y en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado se marca con un conjugado fluorescente; y
- 10 c) sin necesidad de retirar anticuerpos anti-anticuerpo marcados no unidos, identificar una célula productora de anticuerpos capaz de producir un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado detectando el incremento en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean la célula usando un microscopio.
- 15 2. El ensayo de la reivindicación 1, en el que el antígeno se acopla a un eritrocito.
3. El ensayo de la reivindicación 1, en el que el antígeno se acopla a una perla.
- 20 4. El ensayo de la reivindicación 3, en el que el antígeno se acopla a una perla por medio de un anticuerpo policlonal.
5. El ensayo de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo policlonal es un fragmento de anticuerpo.
- 25 6. El ensayo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo policlonal es un fragmento Fab, Fab' o F(ab')₂ de anticuerpo.
7. El ensayo de la reivindicación 1, en el que la célula que expresa el antígeno es una célula transfectada.
- 30 8. El ensayo de la reivindicación 1, en el que la célula que expresa el antígeno es una célula de tumor.
9. El ensayo de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es un agente contagioso.
- 35 10. El ensayo de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc.
11. El ensayo de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado fluorescente se marca con FITC.
- 40 12. El ensayo de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado con FITC es un anticuerpo anti-Fc.
13. El ensayo de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las células productoras de anticuerpos son linfocitos B, células de plasma, plasmablastos, linfocitos B activados o linfocitos B de memoria.
- 45 14. El ensayo de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la célula productora de anticuerpos es una célula de hibridoma o una célula de mamífero modificada para expresar anticuerpos.
15. Un procedimiento in vitro para producir un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado que comprende:
- 50 a) proporcionar una población de células productoras de anticuerpos;
b) incubar sobre un portaobjetos de microscopio dicha población de células productoras de anticuerpos con un antígeno seleccionado conjugado con una perla o acoplado a un eritrocito, o antígeno expresado sobre la superficie de un célula, y un anticuerpo anti-anticuerpo marcado, en el que dicho anticuerpo anti-anticuerpo puede distinguir células que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado de las células que no lo hacen y en el que el anticuerpo anti-anticuerpo marcado se marca con un conjugado fluorescente;
- 55 c) sin necesidad de etapas de lavado, identificar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado detectando el incremento en la concentración de anticuerpos anti-anticuerpo marcados que rodean la célula usando un microscopio;
- 60 d) aislar la célula productora de anticuerpos identificada; y
e) sintetizar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la misma.

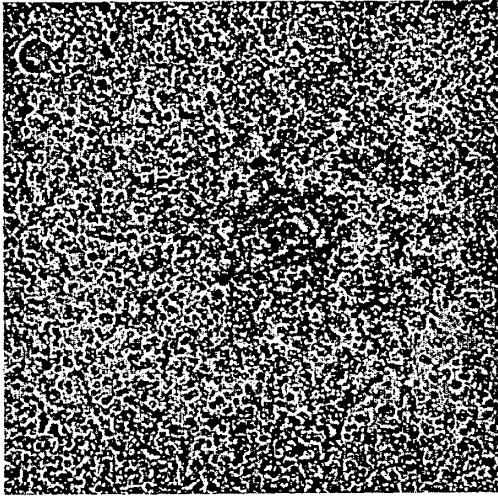
Figura 1



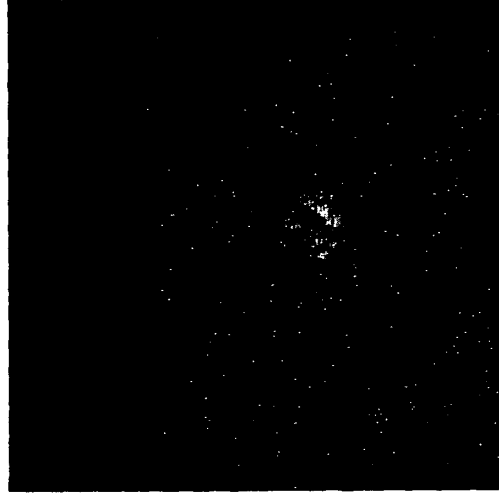
(a)

(b)

Figura 2



(a)



(b)

Figura 3

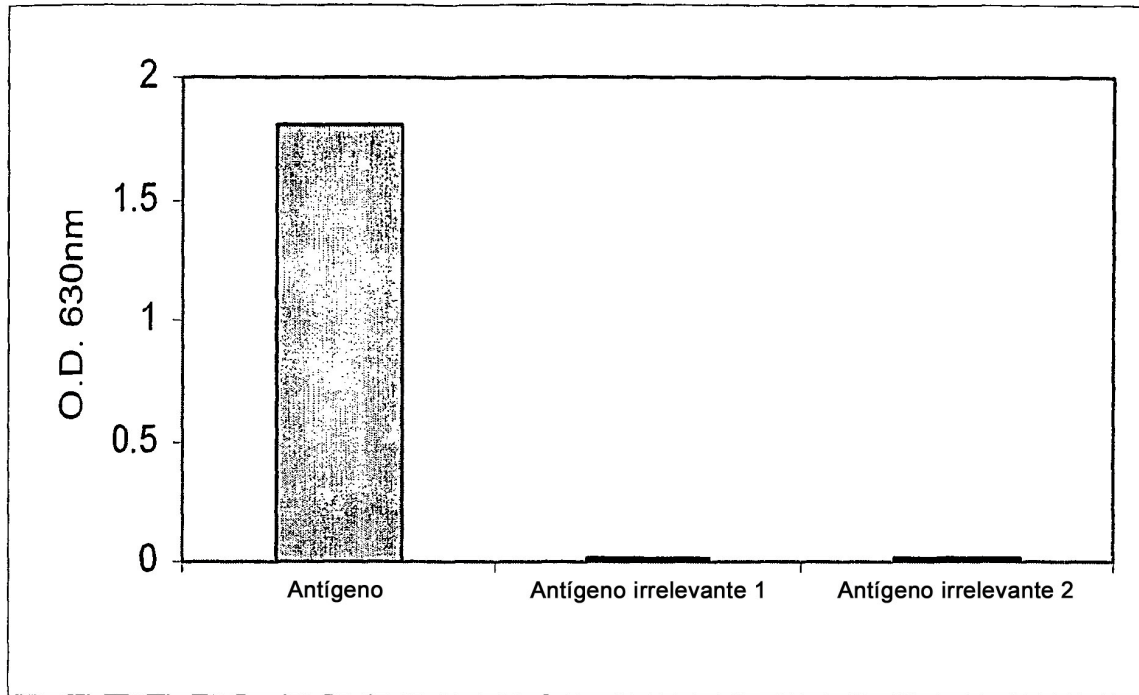
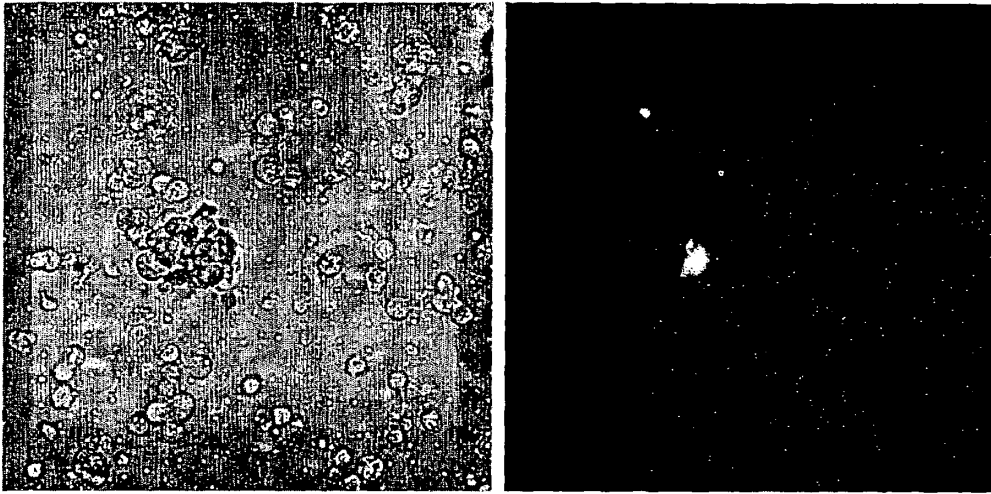


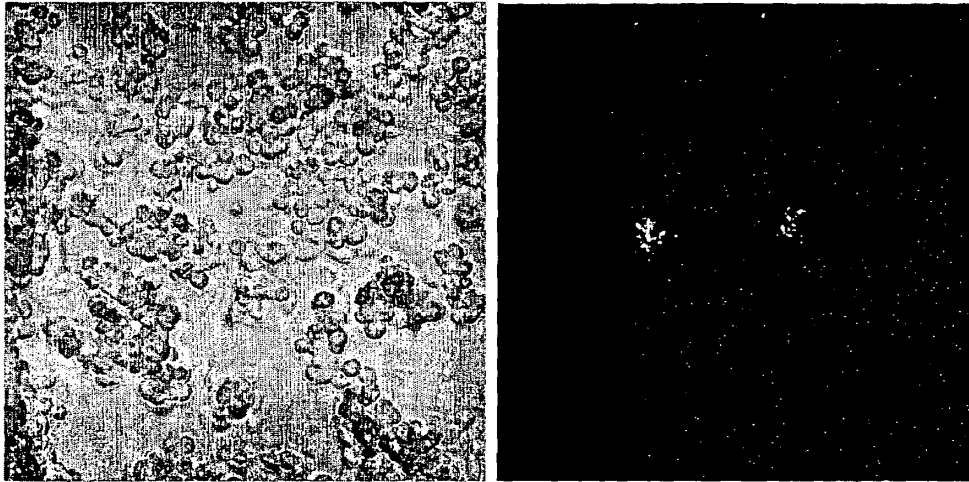
Figura 4



(a)

(b)

Figura 5



(a)

(b)