

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 829**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04768084 .8**
96 Fecha de presentación: **12.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1658500**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **Métodos para obtener anticuerpos**

30 Prioridad:
20.08.2003 GB 0319587
06.02.2004 GB 0402641

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2012

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

72 Inventor/es:
Lawson, Alastair D. G. y
Griffiths, Meryn Ruth

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 385 829 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

Métodos para obtener anticuerpos

- 5 La presente invención se refiere a métodos mejorados para la selección de células que producen anticuerpos específicos para un antígeno de interés.

Los anticuerpos son una clase particular de proteínas que se han desarrollado con fines terapéuticos y diagnósticos. Históricamente, el aislamiento de células que producen anticuerpos específicos para un antígeno de interés se ha realizado utilizando la tecnología de hibridoma. Otros métodos incluyen el aislamiento de anticuerpos procedentes de librerías expresadas en bacterias que están limitados por: (i) restricciones con los límites prácticos del tamaño de las librerías; y (ii) la necesidad de que el anticuerpo se exprese y se pliegue adecuadamente en la bacteria. Se han diseñado una serie de métodos alternativos para permitir que los anticuerpos de alta afinidad generados durante la respuesta inmunitaria *in vivo* se puedan aislar en cualquier especie (Babcock y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci, 93, 7843-7848; WO 92/02551; de Wildt y col., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67 y en Lagerkvist, y col., 1995, BioTechniques 18(5):862-869).

El documento US 5.326.696 describe métodos de tinción con inmunofluorescencia en los que cada antígeno de interés se marca con un fluorocromo diferente. El documento WO 94/09117 describe el marcaje de células con los productos que segregan ellas mismas acoplado las células a su superficie mediante un biomarcador de superficie específico a un par de unión específico para el producto y a continuación permitiendo que el producto sea capturado por el par de unión específico a medida que es segregado y liberado.

Los métodos para la detección y el aislamiento de células que producen anticuerpos específicos para un antígeno de interés son muy conocidos en la materia e incluyen el aislamiento de células que producen anticuerpos mediante la unión a un antígeno biotinilado y la captura sobre cuentas de estreptavidina, ciclos de selección de fagos por afinidad contra superficies plásticas recubiertas de antígeno, la formación de rosetas con glóbulos rojos recubiertos de antígeno, análisis de citometría de flujo y clasificación de células únicas en donde el antígeno está marcado con fluorescencia. El mayor inconveniente de estos métodos es que la presentación de antígeno normalmente es aleatoria de manera que se puede producir el enmascaramiento del epítipo antigénico, que es reconocido específicamente por el anticuerpo producido por la célula. En particular, cuando el antígeno de interés sea una proteína, el marcaje del antígeno, por ejemplo con un marcador fluorescente, es una modificación química de la superficie del antígeno que puede reducir la afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno o evitar dicha interacción. Cuando los antígenos de interés sean proteínas pequeñas o péptidos cortos, la introducción de una modificación química en forma de marcador, tal como un marcador fluorescente, puede interferir de manera que se produzca poca o ninguna unión del antígeno con el anticuerpo específico.

Existen problemas similares cuando el antígeno de interés se proporciona marcado en forma de proteína de fusión. La incorporación de una secuencia adicional en el C-término o en el N-término de una proteína puede producir un plegamiento aberrante de forma que el antígeno no se pliegue en una conformación nativa. Como tal, los epítopos antigénicos expuestos en, por ejemplo, un hospedador inmunizado con un antígeno nativo pueden no estar accesibles en una proteína de fusión del mismo antígeno. Así, en la etapa de enriquecimiento de las células que producen anticuerpos específicos para el antígeno nativo, las células que producen anticuerpos para epítopos que están enmascarados o alterados en la proteína de fusión no se detectarán y no podrán ser aisladas.

Por tanto la utilización de un antígeno no marcado o no marcado es particularmente ventajosa puesto que evita cualquier modificación del antígeno que pueda modificar o enmascarar los sitios de interacción y que, a su vez, pueda producir que no se consiga detectar un anticuerpo específico para el antígeno de interés. Por consiguiente, se proporciona un método de enriquecimiento de una población de células en aquellas células que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés, que comprende:

- a) la puesta en contacto de dicha población con un anticuerpo que reconoce CD5, CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD45 o CD45 RC, uniéndose dicho anticuerpo a un primer marcador fluorescente;
- 55 b) la puesta en contacto de dicha población con un antígeno de interés que está sin marcar;
- c) la puesta en contacto de dicha población con una muestra que comprende un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente dicho antígeno, uniéndose dicho anticuerpo policlonal a un segundo marcador fluorescente; y
- 60 d) la separación de la población de aquellas células que se pueden detectar por estar asociadas con el primer y segundo marcadores fluorescentes, en donde la parte b) se lleva a cabo antes de las partes a) y c), y en donde a la parte b) le sigue una etapa de lavado.

Los términos "células que son capaces de producir un anticuerpo" o "célula que produce anticuerpos" incluyen cualquier célula que segregue un anticuerpo, tal como un linfocito B, una célula plasmática, un plasmablasto, un linfocito B activado, o un linfocito B de memoria. Dichas células pueden producir anticuerpos de cualquier afinidad,

por ejemplo, un anticuerpo de alta afinidad o un anticuerpo de baja afinidad. Los métodos de la invención no dependen de la afinidad del anticuerpo producido por dichas células. Una población que comprende células que producen anticuerpos para su utilización en la invención se pueden obtener de un animal que haya sido inmunizado con un antígeno de interés, o que haya desarrollado una respuesta inmunitaria a un antígeno como resultado de una enfermedad. Por ejemplo, y sin limitación, la población puede comprender una muestra de células sanguíneas periféricas, células esplénicas o células derivadas de un nódulo linfático. Otras poblaciones que comprenden células que producen anticuerpos para su utilización en la presente invención pueden incluir una población de células de hibridoma, una población que comprende cualquier célula transformada, y en particular, una población que comprende cualquier célula de mamífero que exprese genes de inmunoglobulinas o una parte de los mismos. Ejemplos de dichas células de mamífero incluyen, pero no están limitadas a, las células NS0, CHO, COS y 293. En una forma de realización preferida, las poblaciones de células que producen anticuerpos para su utilización en la presente invención producen una variedad de anticuerpos con diferentes especificidades de unión. En otra forma de realización, la población de células que comprende al menos una célula que produce un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés procede de diversas fuentes, por ejemplo, y sin limitación, de diversos nódulos linfáticos que pueden proceder de uno o más animales. También será evidente que se pueden reunir las muestras o poblaciones de células procedentes de dos o más animales para su utilización en los métodos de la invención. En una forma de realización particular, la población de células procede de un ser humano que ha sido expuesto a un antígeno de interés o que ha desarrollado una respuesta inmunitaria a un antígeno como resultado de una dolencia o enfermedad. En tal caso, la muestra que comprende la población de células para el enriquecimiento es preferentemente una muestra de sangre periférica o de uno o más nódulos linfáticos.

Preferentemente, la población se suspende en un medio apropiado para su utilización en los métodos de la invención. Un medio apropiado para el ensayo será aquel que proporcione al menos los requerimientos mínimos para el mantenimiento a corto plazo de la integridad y de las estructuras celulares, tal como un tampón isotónico. Un ejemplo, sin limitación, es un medio para células inmunitarias que comprende el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + suero fetal bovino al 10 %; 2-β-mercaptoetanol 50 μM; glutamina 2 mM; Hepes 20 mM; y penicilina y estreptomina 1x. En dichas condiciones, las células que producen anticuerpos producen y segregan anticuerpos.

Una población que comprende células que producen anticuerpos se puede despojar de células no deseadas, tales como por ejemplo y sin limitación, glóbulos rojos, linfocitos T, macrófagos u otras células, si así se desea. En los métodos de la invención la población de células proporcionada, en la que al menos una de ellas es capaz de producir un anticuerpo, preferentemente se despoja de todos los glóbulos rojos, por ejemplo, utilizando centrifugación o lisis de glóbulos rojos de una forma conocida en la materia.

El término "anticuerpo" incluye cualquier molécula de inmunoglobulina recombinante o de origen natural tal como un miembro de la clase IgG, por ejemplo, IgG1, que incluye un anticuerpo monoclonal o policlonal, cualquier fragmento de inmunoglobulina de unión a antígenos, tal como los fragmentos Fv, Fab' y F(ab')₂, y cualquiera de sus derivados, tal como fragmentos Fv de cadena sencilla. El término anticuerpo que "reconoce un antígeno" incluye un anticuerpo que se une a, o que es específico para, un antígeno de interés. Lo más preferentemente, un anticuerpo se une al antígeno de interés y no se une o no reconoce a otros antígenos no relacionados.

En los métodos de la invención, el anticuerpo de la parte a) más arriba reconoce un biomarcador que es esencialmente único para aquellas células capaces de producir un anticuerpo, por ejemplo, un biomarcador esencialmente único para linfocitos B. "Esencialmente único" incluye un biomarcador que esté presente predominantemente en aquellas células capaces de producir un anticuerpo en comparación con otros tipos celulares, pero no necesariamente con la exclusión de todos los demás tipos celulares. Por tanto, dicho biomarcador también puede estar presente en uno o dos o incluso tres o más tipos celulares. Los respectivos biomarcadores incluyen CD5, CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD45, CD45 RC, aunque el experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar muchos de los biomarcadores "CD" presentes en los linfocitos B. En un ejemplo, el anticuerpo de la parte a) más arriba es un anticuerpo monoclonal. Las células que expresan un biomarcador reconocido por un anticuerpo de la parte a) más arriba se podrán distinguir gracias a que tiene el primer marcador unido. Las células que no sean capaces de producir anticuerpos se podrán distinguir por estar sin marcar o ser negativas. En la forma de realización adicional, las células, dentro de una población, que sean capaces de producir un anticuerpo pueden estar unidas a dos marcadores. En tal caso, un anticuerpo que reconozca un segundo biomarcador diferente y esencialmente único para dichas células está marcado con un tercer marcador, es decir, un marcador que sea diferente de los que están unidos a los anticuerpos de las partes a) y b), más arriba. Las células que producen anticuerpos dentro de la población proporcionada se podrán distinguir por tanto al tener dos marcadores unidos. Así, la selección de aquellas células que porten los biomarcadores seleccionados será posible al distinguir las de aquellas que porten sólo un biomarcador, o ningún biomarcador, en cuyo caso dichas células estarán sin marcar o serán negativas.

En los métodos de la invención, el anticuerpo de la parte c) más arriba es un anticuerpo policlonal que procede de la misma fuente que la de la población de células para el enriquecimiento. En un ejemplo preferido, la fuente de la población de células es un animal inmunizado con un antígeno de interés sin marcar y el anticuerpo policlonal se prepara a partir de una muestra de sangre procedente de dicho animal inmunizado. En otra forma de realización, el anticuerpo de la parte c) anterior está presente en una fracción reunida de sueros policlonales; por ejemplo, está

presente en una fracción reunida de sueros procedente de al menos dos animales que han sido inmunizados con el antígeno de interés. Para un experto en la técnica será evidente que el anticuerpo policlonal puede estar presente en forma de muestra de suero, pero más preferentemente se prepara como una fracción de IgG. Los métodos para la producción de una fracción de IgG son muy conocidos en la materia e incluyen cromatografía de afinidad tales como

5 cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G, y precipitación con sulfato de amonio o ácido caprílico. El anticuerpo policlonal puede ser una IgG completa o uno de sus fragmentos tales como el fragmento Fab', F(ab')₂ o Fab. Los fragmentos se pueden producir utilizando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, utilizando digestión con papaína o pepsina.

10 Los marcadores para su utilización en los métodos de la invención son marcadores fluorescentes. Marcadores fluorescentes adecuados son conocidos en la materia, así como los métodos para la realización del marcaje de anticuerpos con dichos marcadores. Dichos marcadores pueden incluir, pero no están limitados a, Alexa Fluor 488, R-ficoeritrina, Aqua, Texas-Red, FITC, rodamina, un derivado de la rodamina, fluoresceína, un derivado de la fluoresceína, cascade blue, Cy5 o Cy3. Preferentemente, el primer o segundo marcador fluorescente es Alexa Fluor

15 488 o R-ficoeritrina. Se entiende que el primer y segundo marcadores y cualquier marcador posterior, si se utilizase, son marcadores diferentes. En una forma de realización preferida, los métodos de la invención utilizan dos marcadores, es decir, un primer y un segundo marcador fluorescentes. Los anticuerpos marcados se utilizan preferentemente, por ejemplo y sin limitación, a 1-5 µg/ml y la incubación de dichos anticuerpos con una muestra celular se lleva a cabo preferentemente en frío durante un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo, 60 minutos.

20 Para un experto en la técnica será evidente que la concentración de anticuerpo puede ser inferior o superior a los valores indicados, más arriba, y por tanto puede variar entre, por ejemplo, 0,1 µg/ml o inferior y 10 µg/ml o superior.

En los métodos de la invención, el antígeno se proporciona en una forma sin marcar. El término "antígeno" incluye cualquier sustancia que pueda ser reconocida por un anticuerpo, incluyendo proteínas, glicoproteínas y

25 carbohidratos. Preferentemente estos antígenos incluyen proteínas biológicamente activas, tales como hormonas, citoquinas, y sus receptores de la superficie celular, membranas celulares de bacterias o parásitos o sus componentes purificados, y antígenos víricos. En una forma de realización particular, el antígeno se presenta en la superficie de una célula. Dicho antígeno puede ser endógeno o recombinante. Lo más preferentemente, el antígeno está disponible en forma pura obtenida mediante purificación directa a partir de la fuente nativa o mediante

30 expresión recombinante y purificación de dicho antígeno. Una forma pura incluye antígenos que están exentos de contaminantes en al menos el 75 %, 80 %, 85 % o 90 %, y preferentemente exentos de contaminantes en al menos el 95 % o 99 %. Lo más preferentemente, los antígenos son 100 % puros o no presentan contaminantes detectables. En una forma de realización, el antígeno se expresa de manera recombinante como proteína de fusión y el marcador de fusión se ha retirado antes de la utilización del antígeno. La retirada de dichos marcadores es muy conocida en la

35 materia y dicha retirada puede dejar un pequeño número de aminoácidos residuales que normalmente no están presentes en el N-término o C-término del antígeno en su estado nativo, por ejemplo, restos procedentes de una región enlazadora y/o la región de escisión del marcador. Así, el término antígeno "sin marcar" incluye antígenos a los que se les ha retirado un marcador independientemente de si permanecen o no unidos al antígeno restos aminoácidos adicionales como resultado de la escisión. Ejemplos de dichos marcadores son muy conocidos en la

40 materia y hay vectores de expresión disponibles comercialmente que incorporan los códigos de los ácidos nucleicos para dichos marcadores, por ejemplo pero no limitado a, los marcadores myc, FLAG o His.

Preferentemente, la incubación del antígeno a una concentración de 1 µM a 1 pM aproximadamente en presencia de una población de, por ejemplo pero sin limitación, 10⁷ o 10⁹ glóbulos blancos aproximadamente, algunos de los

45 cuales son capaces de producir anticuerpos, se lleva a cabo en hielo durante 60 minutos aproximadamente. Se entiende que el número de células puede ser inferior o superior a 10⁷, y puede ser de 10⁶, 10⁵, 10⁴ o inferior, o de 10⁹ o superior, según se desee. La concentración de antígeno también puede variar y se puede seleccionar según entienda y considere apropiado un experto en la técnica. En una forma de realización, se pueden utilizar bajas concentraciones de antígeno para favorecer la selección de linfocitos B que producen anticuerpos de alta afinidad.

50 En los métodos de la invención, la parte b) se lleva a cabo antes de las partes a) y c) y a la parte b) le sigue una etapa de lavado, en donde el primer y segundo marcadores son marcadores fluorescentes. En una forma de realización, las partes a) y c) se llevan a cabo de manera simultánea y opcionalmente comprenden al menos una etapa de lavado. Las etapas de lavado se pueden llevar a cabo por cualquier medio conocido en la materia, por

55 ejemplo, utilizando tampón fosfato salino (PBS) u otros medios adecuados. La población de células se puede separar de cualquier medio de incubación o lavado utilizando, por ejemplo y sin limitación, la centrifugación. Alternativamente, se puede dejar que las células se asienten con la fuerza de la gravedad seguido de la retirada del tampón de lavado u otro medio.

60 En otra forma de realización, las partes a) y c) se llevan a cabo de manera consecutiva, en cualquier orden, de manera que la ejecución de la parte a) puede estar seguida por la ejecución de la parte c). Para un experto en la técnica será evidente que es posible una permutación, es decir, la ejecución de la parte c) seguida de la parte a). También será evidente que se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado según se ha descrito anteriormente después de la ejecución de cualquiera de las partes a) a d) o una de sus combinaciones.

65 En los métodos de la invención, la separación de aquellas células que están unidas tanto al primer como al segundo

marcador a partir de una población de células se lleva a cabo de manera más preferente utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Alternativamente, dichas células se identifican utilizando un microscopio de fluorescencia. Las células identificadas utilizando este último método se pueden aislar mediante micromanipulación. Así, utilizando los métodos de la invención se puede preparar una población de células enriquecidas que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés. En una forma de realización preferida, la población de células enriquecidas se somete a al menos una etapa de lavado. Alternativamente, la población de células enriquecidas no se lava.

Una población de células enriquecidas obtenidas utilizando cualquiera de los métodos de la invención se puede separar posteriormente, si se desea, para obtener y clonar una o más células que producen un único anticuerpo utilizando cualquier método conocido en la materia. Los métodos para obtener y clonar células que producen un único anticuerpo incluyen métodos tales como, pero no limitado a, el método del anticuerpo linfocítico seleccionado (SLAM) descrito en el documento WO 92/02551 y Babcook y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93: 7843-7848. Otras técnicas incluyen aquellas descritas por Wildt y col., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67 y en Lagerkvist y col., 1995, BioTechniques 18(5):862-869. Los métodos anteriores dependen del aislamiento de células individuales que producen anticuerpos que a continuación se expanden clonalmente, seguido de la selección de aquellos clones que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés, y si se desea, la identificación posterior de la secuencia de sus genes de cadenas variables pesada (V_H) y ligera (V_L).

Alternativamente, la población de células enriquecidas que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés se puede cultivar en placa en uno o más pocillos y se puede seleccionar para la producción de anticuerpo seguido de la identificación de secuencia, si se desea, como anteriormente. En dicho caso, la población de células enriquecidas se divide de manera que una pluralidad de células se coloque en el pocillo para su cultivo. Se prefiere que los pocillos se siembren con entre 2 y 100 linfocitos B; más preferentemente con entre 2 y 75 linfocitos B; más preferentemente entre 5 y 50 linfocitos B; más preferentemente entre 5 y 25 linfocitos B; más preferentemente entre 5 y 15 linfocitos B; más preferentemente entre 8 y 12 linfocitos B; e incluso más preferentemente con 10 linfocitos B/pocillo.

En una forma de realización, los linfocitos B se cultivan durante aproximadamente, o al menos, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días o hasta un mes. Preferentemente, los linfocitos B se cultivan durante 5 a 10 días aproximadamente, más preferentemente durante 6 a 9, o 6 a 8 días aproximadamente.

Lo más preferentemente, las células se cultivan en condiciones adecuadas para la expansión clonal de los linfocitos B. La expansión clonal da como resultado una mayor cantidad de anticuerpo producido y mayores niveles de expresión de ARNm. La expansión clonal preferentemente se lleva a cabo en presencia de un antígeno al cual se une el anticuerpo con la función deseada y que puede ayudar en el aislamiento de anticuerpos de mayor afinidad a través de la maduración de afinidad *in vitro*.

Las condiciones adecuadas para la expansión clonal de linfocitos B son muy conocidas en la materia. Condiciones importantes incluyen el medio de cultivo, el tiempo durante el cual se cultivan las células, la temperatura y el CO_2 atmosférico.

Preferentemente, los linfocitos B se cultivan con células EL-4 irradiadas en medio acondicionado para linfocitos T. Más preferentemente, los linfocitos B se cultivan con células de timoma EL-4 mutantes murinas irradiadas, EL-4/B5, junto con sobrenadante de linfocitos T humanos/macrófagos como fuente de factores de proliferación y diferenciación. Las células EL-4/B5 activan los linfocitos B mediante una interacción célula-célula dirigida no restringida al MHC. La señal de activación no es mitógena en sí misma pero sensibiliza a los linfocitos B a responder a una (IL-2) o a varias citoquinas presentes en el sobrenadante de linfocitos T humanos.

Una vez cultivadas las células, se puede someter a selección a una pluralidad de células cultivadas para comprobar la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que tenga la función deseada. Preferentemente, esto supone la selección del sobrenadante del cultivo de dicha pluralidad de células cultivadas. Cuando las células hayan sido cultivadas en una serie de pocillos, los pocillos se pueden someter a ensayo de manera individual (por ejemplo, tomando el sobrenadante del cultivo de los pocillos) para la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que reconozca el antígeno de interés para así identificar uno o más pocillos que sean positivos para la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que tenga la función deseada. A continuación dichos anticuerpos se pueden obtener de un pocillo positivo. Los anticuerpos se pueden sintetizar directa o indirectamente a partir de las células presentes en el pocillo.

Por consiguiente, se proporciona un método de enriquecimiento de una población de células en aquellas células que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés, que comprende:

a) la puesta en contacto de dicha población con un anticuerpo que reconoce CD5, CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD45 o CD45 RC, uniéndose dicho anticuerpo a un primer marcador fluorescente;

b) la puesta en contacto de dicha población con un antígeno de interés que está sin marcar;

c) la puesta en contacto de dicha población con una muestra que comprende un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente dicho antígeno, uniéndose dicho anticuerpo policlonal a un segundo marcador fluorescente; y

5 d) la separación de la población de aquellas células que se pueden detectar por estar asociadas con el primer y segundo marcadores fluorescentes,

e) el cultivo de una pluralidad de aquellas células asociadas con el complejo antígeno-anticuerpo-partícula;

10 f) la selección de las células cultivadas para identificar aquellas células capaces de producir un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés; y

g) el aislamiento de dicho anticuerpo directa o indirectamente a partir de las células, en donde la parte b) se lleva a cabo antes de las partes a) y c), y en donde a la parte b) le sigue una etapa de lavado.

15 La selección de las células que producen anticuerpos que reconocen el antígeno de interés se puede llevar a cabo mediante cualquier medio conocido en la materia, tal como mediante ensayo de enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o mediante selección para una actividad funcional tal como neutralización de la actividad antigénica, o de las actividades antagonistas o agonistas. Dichos ensayos son conocidos en la materia, por ejemplo, la selección
20 funcional de la unión receptor/ligando. Los anticuerpos se pueden seleccionar basándose en las afinidades de unión tal y como se pueden determinar, por ejemplo, utilizando un dispositivo BIAcore, o utilizando un radioinmunoensayo de competición.

25 El anticuerpo deseado, es decir, el anticuerpo que reconoce el antígeno de interés, se puede aislar directa o indirectamente a partir de las células cultivadas o de sus descendientes. El aislamiento directo se puede conseguir mediante purificación del anticuerpo segregado a partir del sobrenadante del cultivo clonal utilizando técnicas habituales muy conocidas. Alternativamente, se lleva a cabo el aislamiento indirecto. Dichos anticuerpos se sintetizan aislando las regiones génicas de la cadena V_L y V_H o se pueden clonar y utilizar los genes completos para
30 producir anticuerpos recombinantes que reconocen el antígeno de interés.

Dichos anticuerpos pueden incluir fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos y pueden ser, pero no están limitados a, anticuerpos bi-, tri-, o tetravalentes, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de
35 cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y $F(ab')_2$, fragmentos producidos por una librería de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotópicos (anti-Id), fragmentos de unión a epítopos y derivados de cualquiera de las anteriores, por ejemplo, fragmentos FV de cadena sencilla. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de especies no humanas que presentan una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) procedentes de especies no humanas y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089). Los métodos para la creación de estas moléculas de anticuerpo son muy conocidos en la materia (véase por ejemplo, Boss y col., documento US
40 4.816.397; Cabilly y col., documento US 6.331.415; Shrader y col., documento WO 92/02551; Ward y col., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 86, 3833; Riechmann y col., 1988, Nature, 322, 323; Bird y col, 1988, Science, 242, 423; Queen y col, documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142).

45 Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que han sido manipulados genéticamente de manera que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos génicos de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes. Es probable que estos anticuerpos quiméricos sean menos antigénicos. Se pueden preparar anticuerpos bivalentes mediante métodos conocidos en la materia (Milstein y col., 1983, Nature, 305:537-539; documento WO 93/08829, Traunecker y col., 1991, EMBO J., 10:
50 3655-3659). Los anticuerpos bi-, tri-, o tetravalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, documento WO 92/22853).

Los tipos de sistemas de expresión disponibles para producir estas moléculas de anticuerpo incluyen sistemas de expresión en bacterias, levaduras, insectos y mamíferos, cuyos métodos son muy conocidos en la materia (Verma y
55 col., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tales como aquellas descritas en el documento US 4.946.778 también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para el antígeno de interés. Además, se pueden utilizar ratones u otros organismos transgénicos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

60 También se describen anticuerpos obtenidos utilizando los métodos anteriores que se pueden usar sin modificación adicional, o si se desea, después de modificaciones que incluyen la conjugación a una o más moléculas informadoras o efectoras, para cualquier propósito diagnóstico o terapéutico adecuado. Un anticuerpo, opcionalmente conjugado a un resto terapéutico, se puede utilizar terapéuticamente solo o en combinación con un factor(es) citotóxico y/o una citoquina(s). En particular, los anticuerpos se pueden conjugar con un agente
65 terapéutico, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o un resto farmacológico para modificar una respuesta biológica dada. No se debe interpretar que el agente terapéutico está limitado a agentes terapéuticos químicos

clásicos. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un resto farmacológico que puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichos restos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, el interferón α , el interferón β , el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulante de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento.

Los agentes terapéuticos también incluyen citotoxinas o agentes citotóxicos, incluyendo cualquier agente que sea deletéreo (por ejemplo, mortal) para las células. Ejemplos incluyen el taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos también incluyen, pero no están limitados a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros restos terapéuticos pueden incluir radionúclidos tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Wolframio 188 /Renio 188 ; o fármacos tales como pero no limitado a, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, toxoides y suramina.

Las técnicas para conjugar dichos agentes terapéuticos a anticuerpos son muy conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col., eds., 1985 pp. 243-56, ed. Alan R. Liss, Inc.; Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson y col., eds., 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications; Pinchera y col., 1985, eds., pp. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe y col., 1982 "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik y col., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123).

Los anticuerpos para su utilización en la invención incluyen análogos y derivados que están modificados, por ejemplo y sin limitación, mediante enlace covalente de cualquier tipo de molécula. Preferentemente, dicho enlace no impide una unión inmunespecífica. En un aspecto, un anticuerpo se puede conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos (véase el documento US 4.676.980).

También se describe la utilización terapéutica de proteínas de fusión de los anticuerpos (o uno de sus fragmentos funcionalmente activos), por ejemplo y sin limitación, cuando el anticuerpo o uno de sus fragmentos se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), opcionalmente al N-término o al C-término, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una porción de la misma; preferentemente una porción de la proteína de al menos 10, 20 ó 50 aminoácidos). Preferentemente el anticuerpo, o uno de sus fragmentos, están unidos a la otra proteína en el N-término del dominio constante del anticuerpo. Una proteína de fusión del anticuerpo puede facilitar la reducción o purificación de un polipéptido como se describe en el presente documento, incrementar la semi-vida *in vivo*, y mejorar la introducción de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario.

Cuando la proteína de fusión es un fragmento de anticuerpo unido a una molécula receptora o informadora, ésta se puede preparar mediante procedimientos de ADN recombinante o químicos normalizados. Por ejemplo, puede presentar un macrociclo para la quelación de un átomo de un metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unido a ella mediante una estructura puente covalente. Un grupo efector preferido es una molécula polimérica, que puede estar unida al fragmento Fab modificada para incrementar su semi-vida *in vivo*.

La molécula polimérica, en general, puede ser un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquilenileno o polioxilquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o sin ramificar, por ejemplo, un homo- o hetero-polisacárido.

Sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(vinilalcohol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o uno de sus derivados, especialmente, poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como

metoxipoli(etilenglicol) o uno de sus derivados.

Polímeros de origen natural particulares incluyen la lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o uno de sus derivados.

5 "Derivados", como se usa en el presente documento, está previsto que incluya derivados reactivos, por ejemplo, grupos selectivamente reactivos al tiol tales como las maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo formará parte, en algunos casos, del producto como grupo de enlace entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

10 El tamaño del polímero se puede variar a voluntad, pero generalmente estará en el intervalo de pesos moleculares medios de 500 Da a 50.000 Da, preferentemente de 5000 a 40.000 Da, y más preferentemente de 25.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar, en particular, basándose en la utilización prevista para el producto. Así, por ejemplo, cuando se quiere que el producto abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para su utilización en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de en torno a 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular en el intervalo de 25.000 Da a 40.000 Da.

20 Polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tales como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o uno de sus derivados, y especialmente con un peso molecular medio en el intervalo de 25.000 Da aproximadamente a 40.000 Da aproximadamente.

25 Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado se puede unir covalentemente al átomo de azufre de un resto cisteína localizado en el fragmento. La unión covalente en general será un puente disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

30 Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas efectoras o informadoras unidas a él. Las moléculas efectoras o informadoras se pueden unir al fragmento de anticuerpo mediante cualquier cadena lateral de un aminoácido o grupo funcional de un aminoácido terminal disponibles en el fragmento, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o carboxilo libre.

35 Se puede utilizar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados por el polímero como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo en Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que se puede obtener en Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que se puede obtener en Nektar, antes Shearwater).

40 Se pueden utilizar según convenga procedimientos de ADN recombinante o químicos normalizados en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora o informadora, antes o después de la reacción con el polímero activado. Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/09195, WO 89/01476, WO 99/15549 y WO 03/031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora o informadora es una proteína o polipéptido, la unión se puede conseguir utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

50 De manera más preferente, los anticuerpos están unidos a restos de poli(etilenglicol) (PEG). Preferentemente, un fragmento de Fab modificado está PEGilado, es decir, tiene un PEG (polietilenglicol) unido covalentemente a él, por ejemplo, según el método descrito en el documento EP 0948544 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En una forma de realización, el fragmento Fab modificado con PEG presenta un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto de lisina puede estar unido covalentemente al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amina sobre el resto de lisina puede haber unido un polímero de metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total de la molécula efectora entera puede ser, por tanto, de aproximadamente 40.000 Da.

65 Los anticuerpos aislados directa o indirectamente según los métodos de la invención son útiles en la diagnosis. Así, se describe un método de selección y/o diagnóstico o pronóstico de una enfermedad en un sujeto, y/o el control de la eficacia de la terapia para dicha enfermedad, que comprende la etapa de detección y/o cuantificación en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, y la expresión de un antígeno reconocido por un anticuerpo aislado según los métodos de la invención. En particular, la etapa de detección comprende la puesta en contacto de la

muestra con un anticuerpo y la detección de si se ha producido la unión entre el anticuerpo y el antígeno en la muestra.

Los repertorios de dichos anticuerpos, o de sus fragmentos, también son útiles en librerías de bacteriófagos.

5 También se describen anticuerpos preparados directa o indirectamente como resultado de la utilización de los métodos de la invención que también tienen utilidad en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o dolencia que depende del antígeno de interés seleccionado. Por ejemplo, y sin limitación, se puede seleccionar un antígeno restringido a la expresión sobre la superficie de células tumorales para la inmunización de uno o más animales. Por
10 consiguiente, se describe un anticuerpo o uno de sus fragmentos aislados según uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, dichos anticuerpos que están humanizados (véase, por ejemplo, Adair y col., 1992, Immunol Rev. 130:5-40 y el documento WO 91/09967). Por tanto, también se describe la utilización de un anticuerpo preparado usando los métodos de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o
15 profilaxis de una dolencia o enfermedad asociada a la expresión aberrante o actividad aberrante de un antígeno de interés, es decir, reconocida por un anticuerpo identificado con la utilización de los métodos de la invención. También se describe un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada a la expresión aberrante o actividad aberrante de un antígeno reconocido por un anticuerpo aislado según los métodos de la invención que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende dicho anticuerpo. Dicha enfermedad o dolencia incluye cánceres, trastornos autoinmunitarios o
20 trastornos inflamatorios. Para dicha utilización, en general los anticuerpos se administrarán en forma de composición farmacéutica.

Así, también se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés y un diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Cuando en el presente documento se hace referencia a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o dolencia utilizando un anticuerpo o combinación de anticuerpos particulares, se debe entender que dicha referencia está previsto que incluya la utilización de ese anticuerpo o combinación de anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad o dolencia (no forma parte de la invención).
30

La composición descrita habitualmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo de su método de administración deseado al paciente).
35

Los anticuerpos como los descritos se pueden administrar a un sujeto mediante cualquiera de las vías utilizadas convencionalmente para la administración de fármacos, por ejemplo, se pueden administrar por vía parenteral, oral o por inhalación. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del anticuerpo particular, la enfermedad o dolencia involucrada, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad o dolencia y las condiciones físicas del sujeto.
40

Los anticuerpos se pueden administrar en combinación, por ejemplo, de manera simultánea, secuencial o por separado, con uno o más de diferentes compuestos terapéuticamente activos, por ejemplo, compuestos antitumorales o antiinflamatorios.
45

Se describen composiciones farmacéuticas que se pueden presentar de manera conveniente en formas de dosificación unitarias que contengan una cantidad predeterminada de un anticuerpo de la invención por dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo y sin limitación, de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg dependiendo de la dolencia a tratar, la vía de administración y la edad, peso y condiciones del sujeto.
50

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración.

55 Composiciones como las descritas para la administración por vía oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o se pueden presentar en forma de producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su utilización. Las preparaciones orales líquidas pueden contener agentes suspensores como es sabido en la materia.

60 En el caso de preparaciones orales sólidas como las descritas se pueden incluir preparaciones en forma de polvos, cápsulas y comprimidos, vehículos tales como féculas, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desagregantes, y similares. Debido a su comodidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma de dosificación unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso generalmente se utilizan vehículos farmacéuticos sólidos. Además de las formas de dosificación habituales expuestas anteriormente, los anticuerpos también se pueden administrar por medios y/o dispositivos de
65 administración de liberación controlada. Los comprimidos y cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes

convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; agentes de relleno, por ejemplo, lactosa, azúcar, fécula de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para la formación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; agentes desagregantes, por ejemplo, fécula de patata; o agentes humectantes aceptables tales como laurilsulfato sódico. Los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas habituales según los métodos conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Composiciones farmacéuticas como las descritas que son adecuadas para la administración por vía oral se pueden presentar en unidades discretas tales como cápsulas, bolsitas o comprimidos, cada una que contiene una cantidad predeterminada del anticuerpo, en forma de polvo o gránulos, o como disolución o suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, o una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos farmacéuticos, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociación del anticuerpo con el vehículo, que constituye uno o más de los principios necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el anticuerpo con los vehículos líquidos o los vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, moldeando el producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido se puede preparar mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más principios accesorios.

Composiciones farmacéuticas como las descritas que son adecuadas para la administración por vía parenteral se pueden preparar en forma de disoluciones o suspensiones de los anticuerpos de la invención en agua mezclada de manera conveniente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y utilización, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas como las descritas adecuadas para la utilización en forma inyectable incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener agentes antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la composición isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Las disoluciones, dispersiones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Composiciones farmacéuticas como las descritas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, una composición farmacéutica se puede administrar con un dispositivo para inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en los documentos US 5.399.163, US 5.383.851, US 5.312.335, US 5.064.413, US 4.941.880, US 4.790.824 o US 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos incluyen: el documento de EE.UU. 4.487.603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar una medicación a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para la administración de una medicación a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de un fármaco; el documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico con compartimentos multi-cámara; y el documento US 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico. Muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas descritas se pueden formular para asegurar la distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye a muchos compuestos altamente hidrófilos y puede ser preferible administrar las composiciones farmacéuticas en liposomas. Así, los anticuerpos descritos se formulan en liposomas, dichos liposomas que incluyen un resto de direccionamiento. Se describen compuestos terapéuticos en los liposomas que se administran mediante inyección en bolo en un sitio próximo al área problema, por ejemplo, próximo a un tumor. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, los documentos US 4.522.811, US 5.374.548 y US 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, potenciando así la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, Ranade, VV. 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685). Ejemplos de restos de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016); manósidos (Umezawa y col., 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (Bloeman, PG. y col., 1995, FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col., 1995, Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor tensioactivo de la proteína A (Briscoe y col., 1995, Am. J. Physiol. 1233:134), diferentes especies de los cuales pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y col., 1994, J. Biol. Chem. 269:9090); véase también Keinanen, K. & Laukkanen, ML. 1994, FEBS Lett. 346:123; Killion, JJ. & Fidler, U. 1994, Immunomethods 4:273. Las composiciones descritas se pueden presentar en contenedores monodosis o multidosis, por ejemplo, en ampollas y viales sellados y, para mejorar su estabilidad, se pueden almacenar en condiciones crio-deseccadas (liofilizadas) que sólo requiera la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su utilización. El vehículo líquido estéril descrito se puede suministrar en un vial o ampolla aparte y puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. De manera ventajosa, en el vehículo líquido

estéril se pueden incluir agentes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes.

También se describirá la dosificación a administrar de un anticuerpo que variará según el anticuerpo particular, la enfermedad o dolencia involucrada, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y las condiciones físicas del sujeto, y la vía de administración seleccionada; la dosificación adecuada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en seres humanos y animales también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos que se pueden administrar a pacientes (por ejemplo, pacientes humanos) a dosis terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, dosificaciones que producen la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición de la migración de las células tumorales) utilizando cualquier vía de administración adecuada, tal como inyección y otras vías de administración conocidas en la materia para productos clínicos basados en anticuerpos.

Las composiciones descritas pueden contener desde el 0,1 % en peso, preferentemente entre el 10-60 % en peso, o superior, del anticuerpo, dependiendo del método de administración.

El experto en la técnica reconocerá que la cantidad y el espaciamiento óptimos de las dosificaciones individuales de un anticuerpo estarán determinados por la naturaleza y el grado de la enfermedad o dolencia a tratar, la forma, vía y sitio de administración, y la edad y condiciones del sujeto particular a tratar, y que en última instancia el facultativo determinará las dosificaciones apropiadas a usar. Esta dosificación se puede repetir tan a menudo como sea apropiado. Si se manifiestan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se pueden alterar o reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

La figura 1 muestra la neutralización de la señalización de la IL-1 β humana con anticuerpos recombinantes 97 y 100. La neutralización (reducción de la luminiscencia) de la IL-1 β mediante concentraciones crecientes de anticuerpo 97 se presenta en forma de diamantes cerrados, y las concentraciones crecientes de anticuerpo 100 se presentan en forma de cuadrados cerrados. Se incluyeron controles: el círculo abierto muestra la luminiscencia de fondo, el triángulo abierto muestra la producción de luciferasa en presencia de 3 pg/ml de IL-1 β sola, el cuadrado abierto muestra la producción de luciferasa en presencia de 15 pg/ml de IL-1 β sola, y el diamante abierto muestra la producción de luciferasa en presencia de 30 pg/ml de IL-1 β sola.

Ahora se describirá la invención con referencia a la siguiente sección experimental, que es meramente ilustrativa y no se debe interpretar en modo alguno como una limitación del alcance de la presente invención.

Experimental

Selección positiva de linfocitos B específicos para el antígeno mediante citometría de flujo

Inmunización

Cinco ratas de Sprague-Dawley se inmunizaron con 10 μ g de IL-1 β recombinante humana (Peprotech #200-01B) en 200 μ l a 50:50 de adyuvante completo de Freund y PBS estéril. A continuación los animales recibieron una dosis de refuerzo la semana 4 y la semana 7 con 15 μ g de IL-1 β recombinante humana en 200 μ l a 50:50 de adyuvante completo de Freund y PBS estéril. Se tomó una muestra de sangre de cada uno de los animales y los sueros se sometieron a ensayo para la actividad neutralizadora de la IL-1 β (véase a continuación). A continuación, los animales recibieron dosis de refuerzo tres veces más en 4 intervalos semanales aproximadamente con 15 μ g de IL-1 β recombinante humana en 200 μ l a 50:50 de adyuvante completo de Freund y PBS estéril. Dos semanas después de la última dosis de refuerzo, se extrajo sangre y los bazos.

Preparación de linfocitos y esplenocitos de rata (poblaciones para el enriquecimiento)

Los linfocitos se separaron de la sangre entera diluyendo en primer lugar las muestras a 1:10 aproximadamente en PBS estéril. A continuación 8 ml de sangre diluida se estratificaron sobre 5 ml de Mammalian Lympholyte® (Cedarlane Laboratories Ltd. #CL5120) en tubos Falcon de 15 ml. A continuación las muestras se centrifugaron a 800g durante 20 minutos dando una capa blanca de linfocitos bien definida en la interfase entre los líquidos. La banda que contiene estos linfocitos y la capa superior que contiene el "plasma sanguíneo" se transfirieron a un nuevo tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 800g durante 10 minutos para sedimentar los linfocitos. El sobrenadante se recogió y se almacenó a 4 °C para su futura utilización, mientras que las células se lavaron tres veces en medio inmunitario (RPMI, 10 % de FCS, 2 % de HEPES, 1 % de Glutamina, y 1x Pen/Strep). Después del lavado final las células se congelaron en FCS al 90 % y DMSO al 10 % y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Los bazos de rata individuales se transfirieron a medio inmunitario calentado y se cortaron en trozos pequeños. Los trozos se pasaron a través de un colador de red para dispersar los esplenocitos. Éstos se sedimentaron por centrifugación, se retiró el sobrenadante y las células se lavaron abundantemente en medio inmunitario. Los sedimentos celulares se congelaron en alícuotas de FCS al 90 % y DMSO al 10 % y se almacenaron en nitrógeno

líquido hasta su utilización.

Purificación de la proteína G de IgG dirigida contra IL-1 β humana procedente del suero y plasma de rata

5 Fracciones reunidas de un total de 44 ml de plasma y suero procedentes de tres de las ratas inmunizadas se utilizaron para preparar una fracción de IgG para el marcaje con el colorante Alexa Fluor 488. El volumen de las fracciones reunidas de suero/plasma se completó hasta 100 ml con PBS y se pasó a través de una columna de proteína G (18 ml) con un tiempo mínimo de contacto con las cuentas de proteína G de 20 minutos/ml de las fracciones reunidas. Después de la carga la columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna del PBS. La IgG se eluyó en glicina-HCl 0,1 M a pH 2,7 y se neutralizó utilizando Tris-HCl 2 M a pH 8,5, inmediatamente. Las fracciones reunidas de IgG se concentraron y se sometieron a diafiltración en PBS utilizando una celda agitada de Amicon (Millipore, Cat. No. YM1013632).

Purificación y marcaje del anticuerpo policlonal de rata dirigido contra IL-1 β humana

15 Se añadió un total de 30 μ l de éster de O-succinimida de Alexa Fluor 488 10 mM (Molecular Probes Inc. Product No. 20000) en DMSO seco (Perbio Science UK Ltd) gota a gota a aproximadamente 1 ml de IgG (4,5 mg en total) con agitación con un vórtex. Se dejó que se produjese la reacción en oscuridad a 37 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se separó introduciéndola en una columna PD10 (Amersham Biosciences) en PBS (la columna PD10 se preparó bloqueando con el 20 % de PEG, 20.000 MW seguido por el equilibrado en PBS).

Marcaje celular

25 Una alícuota de esplenocitos procedentes de las ratas inmunizadas con IL-1 β humana se recuperó del almacenamiento en nitrógeno líquido, se transfirió a 10 ml de medio inmunitario calentado, se centrifugó y se lavó en medio inmunitario antes de transferirse a un matraz de cultivo de tejidos T175 en 60 ml de medio inmunitario. Los esplenocitos se cultivaron durante toda la noche (16 horas) a 37 °C para retirar todos los tipos de células adherentes de la mezcla celular. Las células que permanecieron en suspensión se contaron y se lavaron en abundancia en PBS frío antes de su utilización.

30 El marcaje celular se llevó a cabo en un tubo Falcon de 15 ml que había sido bloqueado previamente con tampón de bloqueo (5 % de FCS, EDTA 0,1 mM en PBS) en hielo a 4 °C durante 30 min. Se incubaron un total de 3×10^7 células aproximadamente con 60 μ g/ml de IgG de rata ChromPure™ procedente del suero de ratas normales (Jackson ImmunoResearch #012-000-003) y 17 ng/ml de IL-1 β humana (PeproTech #200-01B) en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Después de esta incubación las células se lavaron 3 veces con 15 ml de tampón de bloqueo enfriado en hielo. Después del lavado final las células se resuspendieron en 500 μ l de tampón de bloqueo que contiene 2 μ g/ml de anticuerpo policlonal de rata purificado dirigido contra IL-1 β humana conjugado con Alexa Fluor 488 y 100 μ l de anticuerpo de ratón dirigido contra CD45RA de rata y conjugado a PE (Serotech #MCA340PE), y se incubó en oscuridad a 4 °C durante 1 hora. A continuación las células se lavaron tres veces con 15 ml de tampón de bloqueo enfriado en hielo. Después del lavado final las células se resuspendieron para dar una concentración final de 1×10^7 células por ml en PBS que contiene EDTA 0,1 mM. La muestra se pasó a través de un filtro celular (50 μ m Syringe Filcons BD Bioscience #340603) para eliminar cualquier resto o agregado celular que pudiera causar una obstrucción durante la citometría de flujo.

45 *Análisis FACS*

El análisis y la clasificación FACS se llevó a cabo utilizando un MoFlo® Cytomation y el *software* Cytomation Summit. Se identificó una población específica de células vivas teñidas con el anticuerpo dirigido contra CD45RA de rata y conjugado a PE detectado en el canal FL2, que también se habían teñido positivamente con el anticuerpo dirigido contra IL-1 β humana marcado con FITC en el canal FL1. Esta población con doble marcaje representaba una población enriquecida en linfocitos B que presenta IgG de superficie específica para la IL-1 β humana.

Puesta en placa y cultivo

55 La población enriquecida de células se sembró a 5 células por pocillo en placas tratadas para el cultivo de tejidos de 12 x 96 pocillos que ya contenían una mezcla de cultivo que estimula los linfocitos B. Esta mezcla de cultivo que estimula los linfocitos B consistía en 50.000 células EL4-B5 irradiadas y TSN de conejo al 4 % (sobrenadante de cultivo que estimula linfocitos T de conejo) en un volumen total de 200 μ l por pocillo. A continuación las células se cultivaron durante 7 días antes de someter a ensayo al sobrenadante del cultivo para la secreción de anticuerpo específico para la IL-1 β humana.

Selección - selección de ELISA primario

65 Se utilizó una selección de ELISA del sobrenadante de cultivo para identificar los pocillos que contenían linfocitos B que segregan anticuerpos específicos dirigidos contra la IL-1 β humana. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de

12 x 96 pocillos Nunc Maxisorp (Fisher #DIS-971-010P) recubiertas durante toda la noche a 4 °C con 50 µl/pocillo de 1 µg/ml de anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IL-1β humana en tampón de recubrimiento (bicarbonato sódico 50 Mm a pH 9,6). El tampón de recubrimiento se retiró y se añadieron 50 µl de hIL-1β a 500 ng/ml completados en tampón de bloqueo PEG (PEG al 1 %, 20.000 MW, Tween al 0,1 % en PBS) a cada uno de los pocillos y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,1 %). A continuación las placas se bloquearon con 100 µl de tampón de bloqueo PEG durante 1 hora a temperatura ambiente antes de lavar 3 veces más el tampón de lavado. Se añadieron 40 µl de tampón de bloqueo PEG a cada uno de los pocillos antes de añadir 10 µl del sobrenadante de cultivo procedente de las placas de cultivo de los linfocitos B. A continuación el ensayo se dejó en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado antes de añadir 50 µl de anticuerpo específico IgG Fcγ de cabra dirigido contra F(ab')₂ de rata conjugado con peroxidasa (Jackson InununoResearch #112-036-071) diluido a 1:3000 en tampón de bloqueo PEG. Las placas se incubaron una vez más durante 1 hora a temperatura ambiente antes de lavar 3 veces con tampón de lavado. Por último, se añadieron 100 µl de sustrato TMB (Roche #784974) a cada uno de los pocillos y el viraje de incoloro a color azul reveló pocillos positivos. A continuación las placas se leyeron en un lector de placas Multiskan (Labsystems), utilizando el *software* de Ascent a 630/490 nm, para el análisis de los datos. En particular, se seleccionaron dos anticuerpos positivos por su capacidad neutralizante (véase a continuación).

Ensayo de neutralización - Análisis de Biacore del bloqueo del acoplamiento de la IL-1β/receptor por el anticuerpo

Se llevó a cabo un BIA (Biomolecular Interaction Analysis) utilizando un BIAcore 2000 (BIAcore AB). El fragmento específico inmovilizado Fc de IgG dirigida contra rata (Jackson ImmunoResearch) capturó IgG de una inyección de 40 µl de sobrenadante de cultivo a una velocidad de flujo de 10 µl/min en tampón HBS-EP. Para el análisis cinético, la IL-1β humana se tituló sobre el anticuerpo capturado a diversas concentraciones. Los resultados se muestran en la tabla 1. Los sensogramas para la unión de la IL-1β se referenciaron por duplicado utilizando una celda de flujo bloqueado y un blanco con tampón. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el *software* BIAevaluation 2.1, 3.0 o 3.1.

Tabla 1

Muestra	K _a e ^b	K _d e ^{-b}	K _D pM
97	3,9	3,27	83,8
100	3,61	3,05	84,5

Clonación del gen del anticuerpo específico

Se seleccionaron para clonación a los linfocitos B procedentes de pocillos positivos identificados siguiendo la selección primaria del ELISA que eran específicos para la IL-1β que también presentaron una actividad neutralizadora potencial en la selección Biacore. Para esta etapa se recogió y se lavó en PBS todo el contenido del pocillo antes de sedimentarlo y de suspenderlo en 15 µl de PBS. A continuación la muestra celular se separó en alícuotas de 3 µl y se transfirió a tubos de PCR de 0,5 ml. El ADNc se preparó mediante transcripción inversa utilizando un kit Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen cat.# 18080-044) en un volumen total de 20 µl. Los fragmentos primarios de la PCR se prepararon añadiendo 2 µl de los reactivos de la transcripción inversa y los cebadores primarios adecuados junto con el sistema TaqPlus Precision PCR (Stratagene cat. # 600211) en un volumen total de 50 µl como se describe a continuación. Se llevó a cabo una reacción de PCR secundaria con 2 µl del producto de la PCR primaria, y los cebadores secundarios adecuados junto con el tampón Precision PCR, dNTPs y TaqPlus Precision en un volumen total de 50 µl como se describe a continuación.

Programas del termociclador:

Transcripción inversa

1.	50 °C	60 minutos
2.	70 °C	15 minutos

PCR primaria

1.	94 °C	3 minutos
2.	94 °C	30 segundos
3.	50 °C	30 segundos
4.	72 °C	1 minuto

5.	Ir a la etapa 2	40 ciclos en total
6.	72 °C	5 minutos
7.	4 °C	en espera

PCR secundaria anidada

1.	94 °C	3 minutos
2.	94 °C	30 segundos
3.	55 °C	30 segundos
4.	72 °C	1 minuto
5.	Ir a la etapa 2	40 ciclos en total
6.	72 °C	5 minutos
7.	4 °C	en espera

5 Los fragmentos de la PCR se purificaron utilizando el kit de purificación Qiagen's Qiaquick 8 PCR (Nº de catálogo 28144) y se eluyeron en 80 µl de tampón de elución. Los fragmentos variables de la cadena pesada se digirieron con XhoI y HindIII y se ligaron en los sitios correspondientes del vector de expresión pHFabHC (construcción de expresión en mamífero que contiene γ1 CH1 humana). Los fragmentos de la cadena ligera kappa se digirieron con BsiWI y HindIII y se ligaron en los sitios correspondientes del vector de expresión pMR10-HS (construcción de expresión en mamíferos que contiene Ck humana). Esto produjo la formación de los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo quimérico rata-humano. Se secuenciaron 4 x VH y 4 x VL clones (ADN plasmídico procedente de colonias individuales transformadas) de cada alícuota de sedimento celular. Se identificaron las secuencias consenso y se utilizaron pares de clones relevantes para la expresión transitoria en células CHO.

Expresión en células de mamífero

15 Monocapas de células CHO en placas de 6 pocillos (1,2 x 10⁶ células/pocillos) se transfectaron con 2 µg de ADN plasmídico de cada una de las cadenas pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección Invitrogen's Lipofectamine 2000 (Nº de catálogo 11668-019) según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 5 días a 37 °C, y a continuación los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se sometieron a ensayo para la presencia de Fab, para su capacidad para neutralizar la IL-1 humana y para su afinidad de unión por la IL-1β humana (análisis de Biacore, como se ha descrito anteriormente).

Bioensayo del gen informador dirigido contra IL-1β

25 Células A549 que se habían transfectado de manera estable con el promotor de la E-selectina unido al gen de la luciferasa (en lo sucesivo denominadas células A549-ES-Luc) se crecieron en RPMI 1640 (exento de fenol) que contiene el 10 % de FCS, Glutamina 2 mM y 1 mg/ml de G418. Estas células A549-ES-Luc expresan los receptores IL-1RI. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos opacas (Packard) a 15.000 células/pocillo y se dejó que se adhirieran durante toda la noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. Las muestras para el ensayo se dispusieron en tubos de ensayo individuales, cada tubo que contiene sobrenadante del cultivo (procedente de las células CHO transfectadas, más arriba) o sobrenadante del cultivo control (medio de crecimiento de células CHO sin transfectar). Cada tubo contenía de manera adicional IL-1β humana recombinante (Preprotech) a una concentración final de 30 pg/ml. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio de crecimiento de A549-ES-Luc y se sustituyó con 100 µl del incubado a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se incluyeron pocillos control que no contenían la IL-1β para permitir la corrección de la actividad basal de la luciferasa en estas células. A continuación se sometió a ensayo la expresión de la luciferasa utilizando un kit de ensayo de un gen informador de la luciferasa (LucLite de Packard). La figura 1 muestra los resultados de la neutralización de la señalización del IL-1RI mediante los anticuerpos expresados de manera transitoria, números 97 y 100. Ambos anticuerpos neutralizaron la señalización de IL-1RI como muestra la pérdida de la producción de luciferasa con el incremento de la concentración de anticuerpo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de enriquecimiento de una población de células en aquellas células que producen un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés, que comprende:
- 5 a) la puesta en contacto de dicha población con un anticuerpo que reconoce CD5, CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD45 o CD45 RC, uniéndose dicho anticuerpo a un primer marcador fluorescente,
- 10 b) la puesta en contacto de dicha población con un antígeno de interés que está sin marcar,
- c) la puesta en contacto de dicha población con una muestra que comprende un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente dicho antígeno, uniéndose dicho anticuerpo policlonal a un segundo marcador fluorescente, y
- 15 d) la separación de la población de aquellas células que se pueden detectar por estar asociadas con el primer y segundo marcadores fluorescentes;
- en donde la parte b) se lleva a cabo antes de las partes a) y c), y en donde a la parte b) le sigue una etapa de lavado.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde las partes a) y c) se llevan a cabo de manera simultánea y la ejecución comprende opcionalmente al menos una etapa de lavado.
3. El método de la reivindicación 1, en donde las partes a) y c) se llevan a cabo de manera consecutiva o las partes c) y a) se llevan a cabo de manera consecutiva, y en donde cada una de las ejecuciones comprende de manera
- 25 opcional al menos una etapa de lavado.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la parte a) comprende de manera adicional la puesta en contacto de dicha población con un anticuerpo que reconoce un segundo biomarcador esencialmente
- 30 único para aquellas células presentes en la población que son capaces de producir un anticuerpo, siendo marcado dicho anticuerpo con un tercer marcador.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la separación de las células que producen un anticuerpo que reconoce el antígeno de interés se lleva a cabo utilizando clasificación celular activada por
- 35 fluorescencia.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente:
- e) el cultivo de una pluralidad de aquellas células asociadas con el complejo antígeno-anticuerpo-partícula;
- 40 f) la selección de las células cultivadas para identificar aquellas células capaces de producir un anticuerpo que reconoce un antígeno de interés; y
- g) el aislamiento de dicho anticuerpo directa o indirectamente a partir de las células.

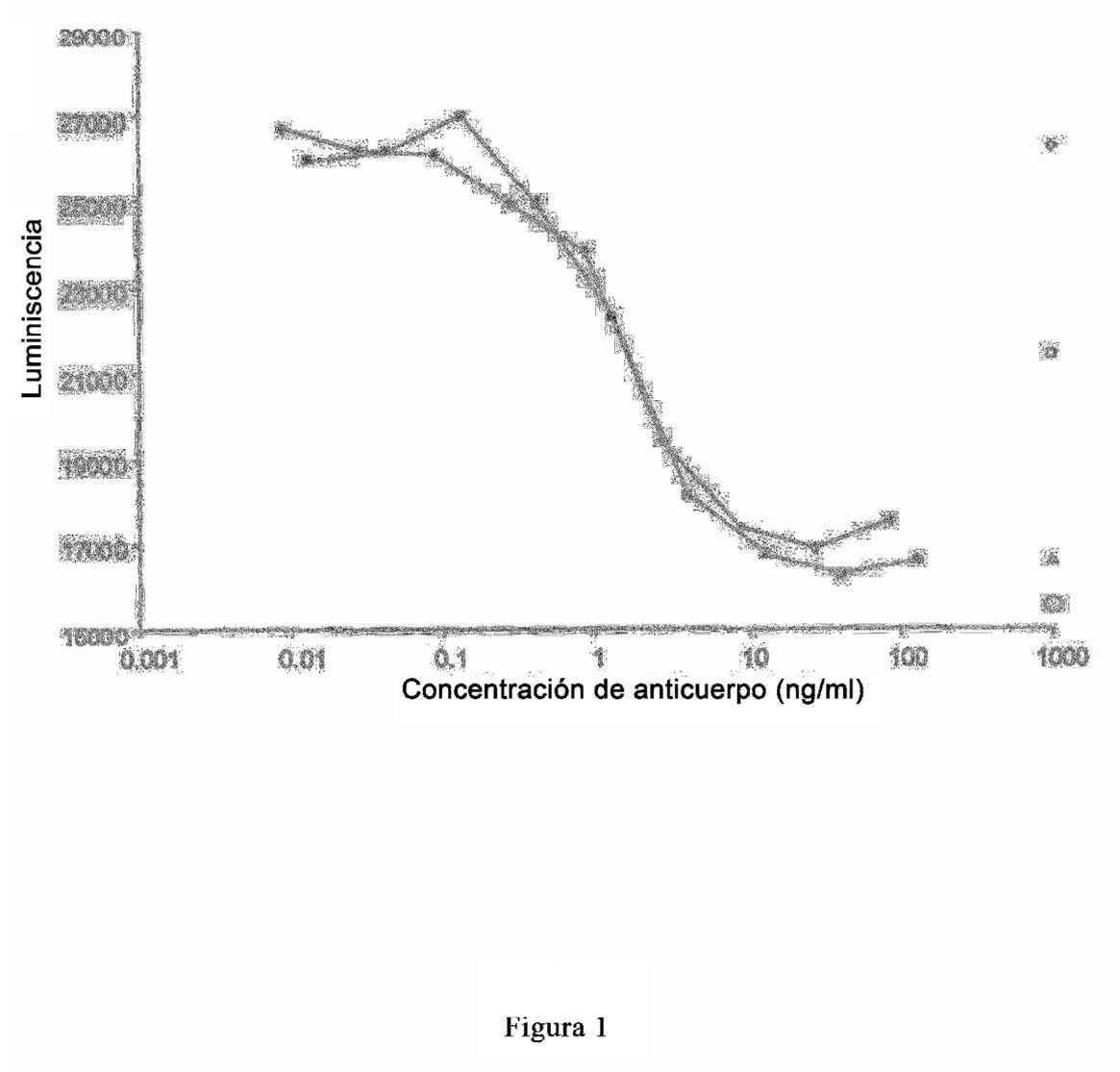


Figura 1