

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 290**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.1995** **E 08075098 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 1942116**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales para la determinación inmunológica selectiva de formas de lamininas de alto peso molecular en líquidos corporales**

30 Prioridad:

11.08.1994 DE 4428481

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

08.05.2014

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)
BRÜNINGSTRASSE 50
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE**

72 Inventor/es:

**GERL, MARTIN, DR.;
STEINERT, CORNELIA y
QUINT, MANFRED**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 459 290 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

Anticuerpos monoclonales para la determinación inmunológica selectiva de formas de lamininas de alto peso molecular en líquidos corporales.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de líneas de células de hibridoma y a un procedimiento para la preparación de anticuerpos monoclonales para la determinación inmunológica selectiva de formas de lamininas de alto peso molecular en líquidos corporales, así como a un procedimiento para la determinación inmunológica de laminina.

La laminina es una proteína de múltiples dominios que se encuentra en todas las membranas basales y que forma complejos con otros componentes distintos, típicos de la membrana basal tales como, por ejemplo, nidógeno, proteoglicano de heparan sulfato o colágeno IV (Timpl, R. (1989) Eur. J. Biochem. 180; 487 a 502). Está compuesta por tres polipéptidos distintos, unidos por puentes disulfuro. En este caso se forma la estructura de una cruz asimétrica (Figuras 1a y 1b).

Recientemente se identificaron muchas variantes estructurales, las cuales se forman por el ensamblaje de 8 subunidades diferentes (conocidas hasta el momento). Para obtener una isoforma de laminina siempre se tienen que reunir polipéptidos de tres clases diferentes de moléculas: una cadena α (anteriormente cadena A), una cadena β (anteriormente cadena B1) y una cadena γ (anteriormente cadena B2) (Burgeson, R.E.; et al. (1994) Matrix Biology, vol. 14, 209 a 211).

A las lamininas se les atribuye un gran número de funciones biológicas interesantes tales como, por ejemplo, la influencia sobre el crecimiento celular, la extensión celular y el crecimiento de las neuritas, así como la inducción de procesos de diferenciación (Timpl, R. (1989) Eur. J. Biochem. 180; 487 a 502).

Aun cuando las lamininas son componentes típicos de todas las membranas basales, las distintas isoformas se caracterizan por una distribución tisular muy específica. La merosina, por ejemplo, (= laminina 2; $\alpha 2, \beta 1, \gamma 1$) es parte componente de las membranas basales de las células de Schwann, de los músculos estriados y de los trofoblastos (Leivo, I.; Engvall, E. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 1544 a 1548).

Otra variante, la laminina s (= laminina 3; $\alpha 1, \beta 2, \gamma 1$) se encuentra en la membrana basal de las sinapsis en las placas terminales neuromusculares, en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los podocitos glomerulares (Hunter, D.D.; Shah, V.; Merlie, J.P.; Sanes, J.R. (1989) Nature 338; 229 a 234).

Un tercer ejemplo, la laminina K (= laminina 6; $\alpha 3, \beta 1/\beta 2, \gamma 1$) es específica de las membranas basales de la piel (Marinkovich, M.P.; Lunstrom, G.P.; Burgeson, R.E. (1992a) J. Biol. Chem. 267; 17900 a 17906). Allí, como componente de los "filamentos de anclaje", se encuentra también la laminina/niceina (= laminina 5, $\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$) típica de los tejidos epiteliales (Marinkovich, M.P.; Lunstrom, G.P.; Keene, D.R.; Burgeson, R.E. (1992b) J. Cell. Biol. 119; 695 a 703).

Para la detección de laminina en suero humano fueron desarrollados métodos de determinación específicos para la diagnosis de diversas enfermedades. Como posibles indicaciones se citan fibrosis/cirrosis hepática, fibrosis hepática alcohólica, complicaciones diabéticas de la membrana basal (BM), enfermedades renales, arteriosclerosis inflamatoria crónica/poliartritis crónica y enfermedades tumorales (Kropf, J.; et al. (1991) Clin Chem. 37; 30; Niemelä, O.; Risteli, L.; Sotaniemi, E.A.; Risteli, J. (1985) Eur. J. Clin. Invest. 15; 132 a 137. Katayama, M.; Kamihagi, K.; Hirai, S.; Murakami, K.; Hino, F.; Kate, I. (1992) Br. J. Cancer 65; 509 a 514. Brocks, D.G.; Strecker, H.; Neubauer, H.P.; Timpl, R. (1986) Clin. Chem. 32; 787 a 791. Horikoshi, S.; Koide, H. (1991) Clin. Chim. Acta 196; 185 a 192).

Actualmente se pueden adquirir comercialmente tres métodos para la determinación de lamininas:

Procedimiento 1:

Un método de determinación de laminina P1 sobre la base de un antisuero policlonal se comercializa por Behringwerke AG bajo la marca registrada "RIA-gnost[®]" (Brocks, D.G.; Strecker, H.; Neubauer, H.P.; Timpl, R. (1986) Clin. Chem. 32; 787 a 791).

Procedimiento 2:

Un inmunoensayo EIA para laminina sobre la base de dos anticuerpos monoclonales (TAKARA, Shuzo Co., LTD; Katayama et al., 1992; Katayama, M.; Kamihagi, K.; Hirai, S.; Murakami, K.; Hino, F.; Kate, I. (1992) Br. J. Cancer 65; 509 a 514).

Procedimiento 3:

Un inmunoensayo enzimático de una etapa, tipo sándwich, basado en dos anticuerpos monoclonales (Fuji Chemical Ltd.; Iwata, K. (1990) Clin. Chim. Acta 191; 211 a 220).

Mientras que en los procedimientos 1 y 3 se utilizan anticuerpos contra el fragmento "Lam P1" resistente a la pepsina, el procedimiento 2 se basa en anticuerpos contra una "laminina nativa", aislada según el método de Wewer

et al. (digestión cuidadosa con pepsina en ausencia de EDTA; Wewer, U.; Albrechtsen, R.; Manthorpe, M.; Varon, S.; Engvall, E.; Rouslahti, E. (1983) J. Biol. Chem. 258; 12654 a 12660).

A partir del trabajo de Katayama (procedimiento 2) se desprende que el inmunoensayo de TAKARA correlaciona relativamente bien con el RIA-gnost[®] (Behringwerke) ($r = 0,68$) aunque en un suero tumoral (pulmonar) se presenta una distribución de antígeno que se desvía del RIA-gnost[®]. A saber, según una cromatografía de filtración en gel de los anticuerpos dirigidos contra la "laminina nativa" en suero se detectan dos picos de antígeno en la zona de pesos moleculares de 330 a 150 kDa. En virtud de su tamaño, se debe tratar aquí de productos de degradación de la "laminina sérica".

El RIA-gnost[®] (procedimiento 1) diagnostica por el contrario dos picos en el intervalo de 100 a 900 kDa, es decir evidentemente tanto estructuras nativas (intactas) como también estructuras degradadas. El reconocimiento común de estructuras de laminina intactas y degradadas conduce, sin embargo, a inexactitudes en el dictamen diagnóstico, puesto que por un lado se pueden solapar el colectivo normal y el colectivo de pacientes y, por otro lado, las fluctuaciones de concentración en un pico se pueden equilibrar por desplazamientos cuantitativos de signo contrario en el otro pico.

Para el inmunoensayo de Fuji (procedimiento 3) no existe cromatografía alguna de un suero. Pero a partir de una electroforesis en gel de SDS y de un borrón de inmunotransferencia se observa que los anticuerpos utilizados reconocen en suero normal y en "suero de cirrosis hepática" una banda de 200 kDa, es decir que evidentemente reaccionan de manera específica con fragmentos degradados de la laminina.

Iwata, K. describe un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich de una sola etapa para laminina humana utilizando anticuerpos monoclonales (Iwata, K. Clinica Chimica Acta. 191 (1990), 211-220). Anticuerpos monoclonales contra la laminina se describen también por Abrahamson D.R. et al. (1989) (Abrahamson D.R. et al. J. Cell Biology (1989), 109, 3477-3491). Katayama et al. (1992) describen, además, fragmentos de laminina como marcadores tumorales (Katayama, M. et al. Br. J. Cancer (1992), 62, 509-514).

Frente a esto, es objeto de la presente invención poner a disposición un procedimiento para la preparación de anticuerpos monoclonales que se unan al fragmento P1 de la laminina y a laminina nativa, intacta, con aproximadamente la misma afinidad.

La presente invención se fundamenta, además, en la misión de poner a disposición un procedimiento para la determinación inmunológica de laminina nativa en base a los anticuerpos que se han de desarrollar. De este modo, en una determinación correspondiente, se eliminan las inexactitudes en el dictamen diagnóstico, como las que se tuvieron que soportar con los métodos de determinación conocidos hasta el momento.

El problema se soluciona conforme a la invención mediante los procedimientos definidos en las reivindicaciones.

Una línea celular de hibridoma de acuerdo con las reivindicaciones se caracteriza preferentemente porque los linfocitos fueron extraídos de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con laminina P1, y porque la línea celular de mieloma es la línea celular P3X63AG8.653 del mieloma de ratón.

Tres líneas celulares de hibridoma, las cuales presentan las propiedades anteriormente indicadas, fueron depositadas en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares), Marscheroder Weg 1b, D-38124-Braunschweig, conforme a las prescripciones del Tratado de Budapest el 12 de julio 1994 con los números de depósito DSM ACC2181, DSM ACC2180 y DSM ACC2182.

Estas líneas celulares de hibridoma producen anticuerpo monoclonales que presentan las propiedades de acuerdo con las reivindicaciones en los procedimientos reivindicados, pero no encuentran uso alguno.

Las líneas celulares DSM ACC2181 y DSM ACC2180 de hibridoma producen respectivamente un anticuerpo de la subclase IgG2a, y la línea celular DSM ACC2182 de hibridoma, un anticuerpo de la subclase IgG1.

Para la solución del problema planteado al principio se pone a disposición un procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal con especificidad por proteínas de la familia de las lamininas y el fragmento de laminina P1 el cual se puede preparar a partir de placenta humana por digestión con pepsina. El procedimiento se caracteriza porque el anticuerpo monoclonal se une al fragmento de laminina P1 y a laminina nativa, intacta, con aproximadamente la misma afinidad, estando excluido un anticuerpo que es producido por la línea celular de hibridoma DSM ACC2181, DSM ACC2180 o DSM ACC2182, caracterizado porque

- a) animales vertebrados, no humanos, se inmunizan con el fragmento de laminina P1, el cual se puede preparar a partir de placenta humana por digestión con pepsina,
- b) se obtienen linfocitos de los animales vertebrados inmunizados y se fusionan con células de mieloma,
- c) se seleccionan los híbridos en cuanto a la presencia del anticuerpo con las propiedades citadas y se clonan, y
- d) a partir de estos clones se obtiene el anticuerpo,

en el que el anticuerpo une las estructuras plegadas nativas de los dominios de laminina P1 de laminina y en el que el procedimiento se caracteriza porque el anticuerpo se forma por un hibridoma que resulta por fusión de células de una línea celular de mieloma y linfocitos de un animal vertebrado no humano inmunizado con fragmento de laminina

P1 de placenta humana y a continuación se selecciona y porque el anticuerpo formado muestra una propiedad de unión a laminina humana purificada y a la forma de elevado peso molecular de la laminina obtenida a partir de suero humano.

5 Además de esto, la misión establecida se resuelve por un procedimiento para la determinación inmunológica de laminina nativa utilizando un anticuerpo estratificado, fijado adhesiva o covalentemente a un material de soporte, y un segundo anticuerpo marcado, el cual reconoce el antígeno unido al anticuerpo estratificado, caracterizado porque el anticuerpo estratificado es un anticuerpo monoclonal conforme a la definición en una de las reivindicaciones 1 a 4.

10 Pero, preferentemente, la misión establecida se resuelve por un procedimiento para la determinación inmunológica de laminina nativa utilizando un anticuerpo estratificado, fijado adhesiva o covalentemente a un material de soporte, y un segundo anticuerpo marcado, el cual reconoce el antígeno unido al anticuerpo estratificado, caracterizado porque el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo monoclonal conforme a la definición en una de las reivindicaciones 1 a 4.

15 Los procedimientos para la determinación inmunológica conformes a la invención se pueden utilizar especialmente en procedimientos para la diagnosis de enfermedades que van acompañadas de una modificación del contenido de laminina en los líquidos corporales, para lo cual los líquidos corporales se extraen del cuerpo vivo, pero no se aportan de nuevo a éste.

20 A continuación se explica la invención con más detalle, especialmente las formas de ejecución preferidas. La invención se define por medio de las reivindicaciones.

25 Para la preparación de los anticuerpos monoclonales se pueden inmunizar animales, especialmente roedores tales como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas, con laminina P1, que fue aislada según el método descrito en el Ejemplo 1, en presencia de coadyuvantes.

30 De modo particularmente preferido se emplean ratones, especialmente los de la cepa Balb/c. Con repetidas inyecciones secundarias, por ejemplo en intervalos de 4 a 8 semanas, se refuerza la respuesta inmune. El éxito de la inmunización se controla por determinación de la concentración de anticuerpos específicos con un ELISA, en sí conocido por el experto en la materia. Algunos días antes de la fusión de los linfocitos con una línea celular de mieloma se tratan los animales con laminina P1 sin coadyuvante. Se obtienen linfocitos de los animales y se fusionan con una línea celular de mieloma, la cual puede proceder igualmente de una de las especies animales anteriormente citadas, preferentemente sin embargo de ratón, especialmente con la línea celular P3X63AG8.653.

35 Ventajosamente, se fusionan linfocitos con líneas celulares de mieloma de la misma especie. La fusión y el ulterior cultivo de los clones celulares se llevan a cabo de un modo conocido por el experto en la materia, determinándose en el líquido sobrenadante del cultivo celular la concentración de los anticuerpos específicos mediante ensayos de unión inmunológicos. A partir de los clones celulares que se originan en la fusión se seleccionan los clones adecuados para la utilización en procedimientos inmunológicos con ayuda de una serie de rastreos expuesta en las

40 Tablas 4 y 5. Se puede trabajar con líneas celulares que se preparan por fusión de linfocitos de ratones de la cepa Balb/c contra laminina P1 la línea celular de mieloma P3X63AG8.653 del ratón

Los anticuerpos monoclonales de los procedimientos conformes a la invención pertenecen al grupo de las inmunoglobulinas, preferentemente a la clase de las proteínas IgG, IgA e IgM. Los anticuerpos de la subclase IgG2a e IgG1 se pueden emplear de manera especialmente ventajosa. Los anticuerpos se caracterizan especialmente

45 porque su afinidad para la laminina intacta es aproximadamente igual a su afinidad para el antígeno de inmunización fragmento de laminina P1, creado por digestión con pepsina (Tablas 2 y 3). La estrategia de rastreo representada en las Tablas 4 y 5 pone en claro que efectivamente la predominante mayoría de los clones obtenidos por la fusión produce anticuerpos monoclonales, los cuales únicamente reconocen el fragmento artificial de la laminina P1 creado por el tratamiento con pepsina. Con gran probabilidad, estos anticuerpos reaccionan con estructuras inmunogénicas que fueron creadas artificialmente como consecuencia de la escisión proteolítica de las cadenas, pero que no se presentan en la estructura nativa de la proteína. Tan sólo unos pocos de los anticuerpos monoclonales obtenidos, pero especialmente los anticuerpos descritos a modo de ejemplo, reaccionan con las estructuras nativas, no generadas por digestión con pepsina en los dominios centrales de la laminina.

55 Para la preparación y caracterización de los anticuerpos conformes a las reivindicaciones es importante que se disponga de una fuente adecuada para la obtención del antígeno de inmunización y de las diferentes variantes estructurales decisivas para el rastreo. La laminina P1 humana así como diferentes preparados de laminina se purifican a partir de placenta humana, según los métodos descritos en los ejemplos. A partir de este órgano se pueden obtener al menos dos isoformas de laminina diferentes (Brown, C.J.; Wiedemann, H.; Timpl, R. (1994) J. Cell

60 Sci. 107; 329 a 338).

Los anticuerpos se pueden utilizar en diferentes procedimientos inmunológicos tales como, por ejemplo, en los ensayos inmunoradiométricos después de marcar el anticuerpo de marcado con cloramina T o reactivo de Bolton-Hunter, así como en otros ensayos de unión competitivos y no competitivos tales como los inmunoensayos

65 fluorescentes, enzimáticos, quimioluminiscentes u otros inmunoensayos, incluidas todas las formas de los radioinmunoensayos (Harlow, E.; Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH; 2ª Ed.; Nueva York; 319 a

359; 553 a 612). En este caso es intrascendente que el anticuerpo estratificado esté unido de forma covalente o no covalente a tubitos de poliestireno, esferitas de poliestireno, partículas paramagnéticas o materiales activados para columnas de cualquier tipo. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales se pueden emplear en procedimientos inmunológicos para el aislamiento y la caracterización, así como para la determinación cuantitativa de laminina en tejidos y líquidos corporales. Se procede según métodos conocidos por el experto en la materia haciendo que una muestra líquida, que contiene laminina, reaccione con uno de los anticuerpos monoclonales conformes a la invención, ya sea en solución o preferentemente sobre un soporte sólido, y determinando la cantidad de laminina a través del complejo antígeno-anticuerpo formado. Los productos de degradación de la laminina en los líquidos corporales, captados hasta el momento conjuntamente o reconocidos exclusivamente en la determinación inmunológica, no son reconocidos en este inmunoensayo, sino que exclusivamente las estructuras de laminina intactas.

La invención se explica más ampliamente en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1 Preparación de laminina P1 humana (antígeno de inmunización)

El antígeno de inmunización laminina P1 es un fragmento de la laminina de un tamaño de 200 a 250 kDa, el cual se puede extraer y aislar del tejido placentario después de una digestión intensiva con pepsina. Este fragmento contiene los dominios internos en forma de bastoncitos (dominios III) de los brazos cortos de las cadenas de laminina α , β y γ (Risteli, L; Timpl, R. (1981) Biochem. J. 193, 749 a 755). Las tres cadenas de polipéptidos (de las cuales existen varias isoformas) están unidas entre sí por puentes disulfuro y se caracterizan por una estructura idéntica tridimensional. Tal como se representa en la Figura 1b, en cada uno de los tramos de las cadenas de las subunidades de la laminina se encuentran enfilados linealmente, unos junto a otros, siete a catorce motivos estructurales, los denominados "EGF-like repeats" (repeticiones iguales al factor de crecimiento epitelial), los cuales se caracterizan todos por el mismo motivo de plegamiento. Cada uno de los 50 a 60 aminoácidos de un "EGF-like repeat", debido a una secuencia típica, fija, de uniones disulfuro, adoptan una estructura en forma de hoja de trébol. A nivel de secuencia, entre los "EGF-like repeats" de las cadenas cortas de laminina existe una identidad > 30 % (Engel, J. (1989) FEBS Lett. 251, N° 1,2; 1 a 7).

El antígeno de inmunización de la laminina P1 se preparó tal como se explica a continuación:

1. Descongelación

1,2 kg de placenta humana se descongelaron en 500 ml de agua + IP, a 4°C durante 16 a 20 horas.
(IP = inhibidores de proteasas = NEM 1 mM, PMSF 1 mM, PCMB 0,28 mM)

2. Homogeneización

Después de la descongelación se ajustó el volumen de la tanda a 2,5 l y se homogeneizó con el Ultraturrax durante 3 a 5 minutos.

Finalmente, se centrifugó a 6500 x g durante 10 minutos a 4°C.

3. Lavado

El precipitado obtenido se agitó 8 veces con respectivamente 1,8 l de NaCl 3 M, Triton X-100 al 0,1%, Tris/HCl 0,02 M, pH 7,4 + IP y, a continuación, se centrifugó a 6500 x g, 10 minutos, 4°C. Finalmente, el precipitado se agitó en agua y se centrifugó de nuevo. El precipitado se extrajo a 4°C durante 64 horas con 3 L de tampón (NaCl 1 M, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1 %, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,6 + IP). El material no soluble se separó por centrifugación a 26000 x g (30 minutos) y se siguió elaborando.

4. Digestión con pepsina

El último precipitado se agitó en 3,0 l de ácido acético 0,5 M, EDTA 10 mM, se homogeneizó con el Ultraturrax durante 3 minutos y se siguió agitando durante 2 horas más. El valor del pH de la tanda se ajustó después a 2,5 con ácido fórmico. La digestión proteolítica tuvo lugar después de la adición de 100 mg de pepsina a 4°C y duró 40 h. Después de la digestión con pepsina se separaron las turbideces presentes por 30 minutos de centrifugación a 26000 x g (4°C).

5. Precipitación ácida con NaCl

En el sobrenadante de la centrifugación (3,16 l) se introdujeron bajo agitación 366,1 g de NaCl (= 1,9 M) y se siguió agitando durante 2 horas más.

El precipitado formado se separó por centrifugación del tampón ácido a 6500 x g (4°C, 10 min), se disolvió en 1,8 L de NaCl 0,02 M, urea 2 M, Tris/HCl 0,05 M, pH 8,6 y se dializó 7 veces frente a 8 L del mismo tampón. Las turbideces en la solución se pudieron separar por centrifugación (30 minutos, 26000 x g, 4°C).

6. Cromatografía en Q-sefarosa FF (5x15 cm)

Se efectuaron en cada caso 5 separaciones y se aplicaron sobre la columna respectivamente 350 ml de muestra.

Condiciones de elución: Tampón A; NaCl 0,02 M, Tris/HCl 0,05 M, EDTA 1 mM pH 7,4
Tampón B; NaCl 1 M, Tris/HCl 0,05 M, EDTA 1 mM pH 7,4

Caudal: 3 ml/min
 Gradiente lineal (90 ml) de NaCl 0,02 a 0,1 M
 Gradiente escalonado; 300 ml de tampón con NaCl 0,1 M
 450 ml de tampón con NaCl 0,25 M
 300 ml de tampón con NaCl 0,5 M

Cada una de las fracciones de la cromatografía se analizaron con ayuda de laminina P1 RIA-gnost® y las fracciones de laminina P1 obtenidas (elución con NaCl 0,25 M) se agruparon.

7. Precipitación con sulfato de amonio

El grupo que contiene laminina P1 se diluyó 3:1 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M y se incubó durante 2 horas a 4°C. El precipitado se obtuvo por 30 minutos de centrifugación a 26000 x g (4°C).

8. Cromatografía en superosa 6 prep grade 16/50

La proteína precipitada se disolvió en un volumen adecuado de fosfato-Na 50 mM, NaCl 0,15 M, azida de Na al 0,02 % pH 2,0 y se separó en porciones de 2 ml por medio de la cromatografía de filtración en gel.

Condiciones de elución: Tampón; fosfato de Na 50 mM, NaCl 0,15 M, azida de Na al 0,02 % pH 2,0
 caudal; 1,0 ml/min

Cada una de las fracciones de la cromatografía se analizaron otra vez con ayuda de la laminina P1 RIA-gnost®. Se reunieron las fracciones que contienen laminina de las 25 cromatografías separadas y se les añadió NaOH 2M, de manera que se ajustaba un valor de pH de 8,0. La solución se mezcló después 3:1 con una solución 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se incubó durante una noche. El precipitado formado se separó por centrifugación a 26000 x g (30 minutos, 4°C) y se disolvió en 20 mL de NH_4HCO_3 0,2 M.

9. Digestión con colagenasa

A la solución se añadieron aproximadamente 1 mg de colagenasa, así como una punta de espátula de MgCl_2 y CaCl_2 y se incubó durante 4 horas a 37°C. La digestión proteolítica se detuvo por adición de 3 ml de ácido fórmico.

10. Cromatografía en superosa 6 prep grade 16/50

Después de la digestión se cromatografió de nuevo tal como se ha descrito anteriormente.

Las fracciones positivas en el RIA se diluyeron 3:1 (después de haber sido ajustadas con NaOH 2 M a un valor de 8,0) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y en esta forma se conservaron a 4°C.

El precipitado formado se suspendió en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M, se distribuyó en 22 porciones de 0,5 mL y se centrifugó en la centrífuga de Eppendorf durante 4 minutos. A partir del sobrenadante de las partes alícuotas se tomaron en cada caso 0,48 mL.

La laminina P1 aislada se puede conservar como precipitado de sulfato de amonio a 4°C al menos durante 4 meses sin pérdida de contenido.

11. Rendimiento/calidad

Determinación de la concentración con laminina P1 RIA-gnost® :
 108 600 E (23,9 mg)

Característica en el RIA:

Curva de inhibición lineal

Enlace-So = 66,9 %

50% interceptado = 1,302 U/ml

Suero normal = 1,72 U/ml

Ejemplo 2

Preparación de la carga I de laminina

Las etapas de lavado y la extracción tienen lugar tal como se describe en el Ejemplo 1.

En una Ultrasette (300 kDa) la proteína extraída se transvasa a un tampón de urea 2 M, Tris/HCl 0,05 M, NaCl 0,02 M, EDTA 2 mM, pH 7,4 y se aplica sobre una Q-sefarosa FF 60/14. La proteína ligada se puede eluir en NaCl 0,15 M, disuelto en el tampón de aplicación. El material eluido se concentra nuevamente con la Ultrasette (300kDa) y se cromatografía a través de una superosa 6 prep. grade 16/50 con un caudal de 1 ml/min en PBS, EDTA 2 mM. Las fracciones que contienen laminina (determinadas con laminina P1 RIA-gnost®) se reúnen, se concentran con la Ultrasette y se incuban a la TA con 5000 unidades de benzonasa (pureza II) durante >2h. A continuación se aplica la muestra sobre una ConA-sefarosa 4B (2,6 x 10 cm) equilibrada con NaCl 0,15 M, Tris/HCl 0,05 M, pH 7,4. Con un caudal de 1 ml/min se puede eluir de nuevo la laminina con metil α -D-manopiranosida 0,4 M en el tampón de equilibrio. Para una purificación ulterior y con la finalidad de un transvase a un tampón PBS + EDTA 2 mM, el material eluido se cromatografía con una Sephacril S500 Superfine (2,6 x 140 cm, 1 ml/min).

Ejemplo 3

Preparación de la carga II de laminina

Las etapas de lavado y la extracción tienen lugar como se describe en el Ejemplo 1.

El extracto de EDTA que contiene laminina se concentra con ayuda de una Ultrasette (300 kDa) hasta 25 ml y al mismo tiempo se traspara a tampón Tris/HCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8,0. A continuación se incuba a la temperatura ambiente con 5000 unidades de benzonasa durante 2 horas. La solución así tratada se conduce después por una columna de afinidad anti MAK P1, a la cual se habían acoplado covalentemente (según datos del fabricante) 4 anticuerpos monoclonales diferentes con propiedades de unión, tanto a la laminina P1 como también a la laminina intacta. Los anticuerpos monoclonales siguientes, caracterizados así por los autores de la invención para su diferenciación, se inmovilizaron en una CNBr-Sepharose 4B (6 ml) activada: A24/2/2 (2,7 mg), A 27/2/1 (1,5 mg), A9/2/1 (0,6 mg) y A 28/1/1 (5,2 mg).

A la columna de afinidad (equilibrada en NaCl 0,1 M, Tris/HCl 0,05 M, EDTA 10 mM, Pefabloc 0,1 M, pH 7,4) se aplican 25 ml de extracto de EDTA con un caudal de 1 ml/min, y después se eluye con glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7. El valor del pH del material eluido se debe neutralizar inmediatamente con ayuda de una solución Tris 0,8 M, y finalmente se trasvasa a un tampón NH_4HCO_3 0,1 M + EDTA 2 mM con ayuda de un Macrosep 100 kDa.

Ejemplo 4

Producción de hibridoma

Ratones de la cepa Balb/c se inmunizan subcutáneamente con 20 µg de laminina P1 obtenida según el Ejemplo 1, en presencia de coadyuvante de Freund completo. Al cabo de 4 semanas y al cabo de tres meses se refuerza la reacción inmune por otra inyección subcutánea de 20 µg de laminina P1 en presencia de coadyuvante de Freund incompleto. Tres días antes de la fusión se refuerza la respuesta inmune por inyección intraperitoneal de otros 100 µg de laminina P1.

Para la fusión se sacrifican los animales y se aíslan las células del bazo. En presencia de polietilenglicol se fusionan las células del bazo con la línea celular P3X63AG8.653 de mieloma. Por cultivo de la mezcla de fusión en el medio de hipoxantina-aminopterina-timidina durante un espacio de tiempo de dos semanas se seleccionan las células híbridas de bazo x P3X63AG8.653. Los clones celulares obtenidos se sublonan múltiples veces para conseguir una línea celular estable. Las colonias celulares que se originan se ensayan en diferentes ensayos de unión inmunológicos en cuanto a la producción de anticuerpos. Las líneas celulares originadas a partir de las cuales se obtienen los anticuerpos A27/2/1, A9/2/1 y A33/2/20, nominados así por los autores de la invención para su diferenciación, se han depositado en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Merscheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, conforme a las prescripciones del Tratado de Budapest el 12 de julio de 1994 con los números de depósito DSM ACC2181, DSM ACC2180 y DSM ACC2182.

Ejemplo 5

Ensayos para la caracterización e identificación de anticuerpos monoclonales específicos

En las Tablas 4 y 5 se representa una secuencia cronológica del rastreo.

La inmunización de ratones con laminina P1 conduce a un extraordinario número de clones de hibridomas productores de anticuerpos. Para encontrar ahora los clones que producen anticuerpos monoclonales contra motivos estructurales que se presentan en los correspondientes dominios de la molécula nativa de laminina, se tuvo que llevar a cabo un rastreo diferencial, en el cual con los métodos más variados de análisis inmunológicos se puede detectar la unión de los anticuerpos monoclonales a estructuras nativas o, respectivamente, naturales. Los anticuerpos que tan sólo reaccionaban con la laminina P1 purificada fueron separados inmediatamente.

Para llevar a cabo los experimentos se tiene que obtener laminina nativa por extracción de placenta humana (véanse los Ejemplos 2 y 3). Pero en este caso hay que tener cuidado de que por una purificación demasiado exhaustiva de una forma de laminina dominante, no se limite demasiado el espectro de las formas de laminina posiblemente presentes. A partir de un trabajo de Brown et al. (Brown, C.J.; Wiedemann, H.; Timpl, R. (1994) J. Cell Sci. 107; 329 a 338) se desprende que a partir de la placenta se pueden obtener al menos dos variantes de laminina diferentes (laminina 2 y laminina 4).

Como extremadamente importante parecía ya en las fases tempranas del proceso del rastreo ensayar la reacción de los anticuerpos monoclonales con las estructuras de laminina presentes en el suero. Para estos exámenes se tiene que aislar la laminina sérica con ayuda de una columna Sephadex S-400 (1,0 x 30 cm) a partir de aproximadamente 20 ml de suero de personas de ensayo sanas. Los antígenos del suero eluyen de la columna en dos anchos picos, conteniendo el pico 1 estructuras antigénicas con pesos moleculares > 600 kDa. El pico 2 contiene productos de degradación de la laminina sérica con pesos moleculares en el orden de magnitud del antígeno de inmunización (aprox. 200 kDa) y, respectivamente, fragmentos menores. En el transcurso del rastreo se seleccionan tan solo los anticuerpos (clones) que, junto a su propiedad de unirse a la laminina humana purificada procedente de la placenta, manifiestan también una buena reacción con la "laminina sérica", preferentemente con la forma de alto peso molecular. Otro criterio de selección es la capacidad de unirse al antígeno a la par con un segundo anticuerpo

monoclonal. En la Tabla 6 se demuestra, con ayuda del ejemplo de algunos anticuerpos monoclonales de la misma inmunización, cómo los elementos individuales del rastreo (véanse las Tablas 4 y 5) en su aspecto conjunto hacen posible una caracterización y selección de los anticuerpos monoclonales conformes a la invención. La Tabla 7 recopila los ensayos, que apuntaban a analizar las propiedades de unión a la laminina sérica en comparación con los estándares reconocidos.

Ejemplo 6

Marcación radiactiva de los anticuerpos monoclonales A 27/2/1 y A 9/2/1

0,2 ml de una solución con 40 µg de los anticuerpos monoclonales en tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4, se disponen previamente en un tubito para ensayo de poliestireno (12 x 55 mm) y se mezclan con solución de Na ¹²⁵I de 100 MBq, tamponada con tampón fosfato 0,5 M, pH 7,4. Después de la adición de 50 µl de una solución acuosa de 20 µg de cloramina T se mezcla durante 1 minuto. A continuación, se finaliza la reacción de yodación por adición de 50 µl de una solución acuosa de 20 µg de disulfito de sodio.

El Na ¹²⁵I sin reaccionar se separa a continuación de los anticuerpos monoclonales marcados con ¹²⁵I por cromatografía en un intercambiador de aniones o en una cromatografía de filtración en gel PD-10. Los anticuerpos purificados, marcados con ¹²⁵I, tienen una actividad específica de 5 a 12 mCi/mg (180 a 450 MBq/mg).

Ejemplo 7

Recubrimiento de los tubitos para ensayo con anticuerpos

Para la fijación del anticuerpo monoclonal A27/2/1 a los tubitos de poliestireno (12 x 75 mm) se incuban en cada tubito 0,5 ml del anticuerpo monoclonal A27/2/1 en una concentración de 20 µg/ml en PBS durante 20 horas a la TA. Después de filtrar con succión la solución de anticuerpos se bloquea con 1 ml de PBS/1 % BSA durante 1 hora a la TA. Después de filtrar con succión la solución, los tubitos se pueden guardar en la nevera.

Ejemplo 8

Ensayos inmunoradiométricos

Variante de ensayo 1: A27/2/1 – ¹²⁵I A9/2/1

En los tubitos recubiertos se pipetea respectivamente, a 17 hasta 25°C, 50 µl de muestra o 100 µl del estándar y se completan con 150 µl de PBS/Tween. Después de 2 horas de incubación se filtran con succión y se lavan 2 veces. A continuación se añaden 200 µl de ¹²⁵I A9/2/1 y se incuba de nuevo durante 2 horas a la TA. Después de filtrar con succión y después de dos etapas de lavado se puede determinar en el contador-γ la actividad ligada.

Variante de ensayo 2: A27/2/1 – ¹²⁵I A33/2/20

En los tubitos recubiertos se pipetea respectivamente, a 17 hasta 25°C, 200 µl de muestra o de estándar. A continuación se añaden 200 µl de marcador y se incuba durante 4 horas a la TA. Después de filtrar con succión y de dos etapas de lavado se puede determinar en el contador-γ la actividad ligada.

Antígeno estándar

Como estándar se emplea laminina P1 del kit de RIA-gnost® Lam-P1 (Behringwerke AG, Marburg). Con ello, los dos ensayos tienen una magnitud de referencia común y se pueden comparar bien entre sí y con la Lamp P1 RIA-gnost®.

Ejemplo 9

Determinación de la distribución de pesos moleculares de las muestras estándar y los antígenos que reaccionan con los procedimientos de ensayo descritos, en sueros normales así como en sueros patológicos

Laminina P1, laminina humana (carga II), así como diferentes sueros se fraccionan según el peso molecular con ayuda de una columna de Sepharose S-400. Después se examina la distribución de las magnitudes de antigeneidad de la laminina con ayuda de los procedimientos de ensayo inmunoradiométricos. En el caso de un grupo de suero normal los resultados se comparan con la Lam P1 RIA-gnost®. En las Figuras 2 a 4 se muestran los cromatogramas de los estándares y de un grupo de suero normal.

Dimensión de la columna : 1,0 x 30 cm

Tampón de elusión: PBS + Tween-20 al 0,04% + azida de Na al 0,02%

Caudal: 0,2 ml/min

La calibración de la columna se efectuó con los marcadores de pesos moleculares tiroglobulina (670 kDa), inmunoglobulina (156 kDa), ovalbúmina (44 kDa) y mioglobina (17 kDa).

En las Figuras 5 a 7 se representan sueros individuales de pacientes con patología hepática alcohólica, PBC (cirrosis biliar primaria) y CAH (hepatitis crónica activa).

La Figura 8 muestra un Semidry Blot (semiseco) según la prescripción estándar con un sistema tampón discontinuo después de la separación de aproximadamente 1 µg de laminina carga II (Ejemplo 3) por electroforesis en gel SDS (gel acabado Novex 4 a 12 % de poliacrilamida) bajo condiciones reductoras (+ SH) y, respectivamente, no reductoras (-SH). La membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras y las tiras individuales se incubaron con los anticuerpos monoclonales A9/2/1, A27/2/1 y A33/2/20. Como segundo anticuerpo se utilizó fosfatasa alcalina anti-ratón (Sigma A 5153).

Es evidente que con los ensayos conformes a la invención se obtienen motivos de distribución de antígeno típicos y en cada caso característicos. Esto es un claro indicio de que los dos procedimientos de determinación inmunológicos reconocen específicamente diferentes formas de laminina.

Además de esto, se puede ver que los anticuerpos monoclonales no presentan reacción alguna con las estructuras desnaturalizadas formadas por reducción. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales conformes a la presente invención reconocen específicamente los motivos estructurales plegados de forma nativa de los dominios de la laminina-P1.

Ejemplo 10

Determinación de las propiedades para unión a diferentes preparados de laminina/laminina P1

Para poder estimar someramente qué estructuras de laminina son reconocidas por los dos ensayos, se examinaron diferentes preparaciones de laminina. La siguiente Tabla no permite ciertamente clasificaciones unívocas, pero indica claramente que los dos ensayos enlazan determinadas variantes con prioridades diferentes (afinidades).

La pregunta de cual de las isoformas de la laminina puede ser reconocida por los métodos de ensayo descritos no se puede aclarar mediante los datos mostrados. Una solución de este problema sólo sería posible si varias isoformas (en su forma nativa) estuvieran presentes de manera purificada.

Determinación de la concentración en %, referida a la concentración total de proteínas de la muestra	A27/A9	A27/A33
Laminina (Chemicon; Wewer 1983) ^{*)} ;	2,7	1,4
Merosina (Chemicon; Ehrig 1990) ^{**)} ;	35,8	13,3
Laminina humana, purificación véase Ejemplo 2	21,4	2,8
Laminina humana, purificación véase Ejemplo 3	59,8	80,4
Lam-P1: RIA-gnost [®] Standard 7; % de unión referido a los cálculos empleados	64,9 %	35,4 %

^{*)} Wewer, U.; Albrechtsen, R.; Manthorpe, M.; Varon, S.; Engvall, E.; Burgeson, R.E. (1983a) J. Biol. Chem. 258; 12654 a 12660).

^{**)} Ehrig, K.; Leivo, I.; Argraves, S.W.; Ruoslahti, E.; Engvall, E.; 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87; 3264 a 3268).

Ejemplo 11

Reacciones cruzadas

La Tabla 8 muestra que en los dos nuevos ensayos de laminina no son detectables reacciones cruzadas dignas de mención en relación con proteínas séricas y proteínas del tejido conjuntivo humano, seleccionadas. Igualmente, tampoco se pudo detectar ninguna reacción cruzada en relación con laminina/nidógeno y laminina P1 del tumor EHS del ratón.

Ejemplo 12

Determinación de los contenidos en suero, promediados, en colectivos de pacientes con diferentes enfermedades

Se analizaron diferentes colectivos séricos conforme a las prescripciones del Ejemplo 8, con ayuda de los ensayos inmunoradiométricos conformes a la invención. Los resultados de las determinaciones cuantitativas se recopilan en las Tablas 9 a 17. Las dos variantes de análisis diagnostican en las indicaciones de enfermedades hepáticas alcohólicas, PBC (cirrosis biliar primaria), CAH (hepatitis crónica activa), cirrosis hepática descompensada, cirrosis de origen desconocido, así como en sueros tumorales niveles incrementados de laminina, y en la indicación de diabetes se encuentran contenidos de laminina claramente disminuidos. Con ayuda de las correlaciones de los ensayos conformes a la invención con respecto a la Laminina P1 RIA-gnost[®], indicadas en las Tablas, se ve claramente que los dos procedimientos inmunológicos se diferencian entre sí y que los dos ensayos discrepan del RIA-gnost[®] en cuanto a su dictamen diagnóstico. Con ello se confirma el efecto descrito en el Ejemplo 9 - una diferencia en el motivo de distribución del antígeno.

Abreviaturas

EDTA: Ácido etilendiamino-tetraacético
 NEM: N-etilmaleinimida
 5 PBS: Solución salina tamponada con fosfato (solución tampón PM 16, Serva)
 PCMB: Sal sódica del ácido 4-hidroximercurio-benzoico
 PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Productos químicos, enzimas

10 Colagenasa, Worthington (CLSPA)
 Pepsina, Boehringer Mannheim (Nº 108057)
 Benzonasa, Merck Darmstadt (Nº 1654)

15 Todos los productos químicos utilizados se especificaban con "p.A." (para análisis); se adquirieron de las razones sociales Riedel d.H. y Merck.

Medios de separación

Q-Sepharose® FF, Pharmacia
 Superose® 6 (16/50), Pharmacia
 20 Ultrasette® (300 kDa), Filtron
 Sepharose® activada con BrCN, Pharmacia
 ConA-Sepharose® 4B, Pharmacia
 Sephadex® S-400, Pharmacia

25 Aclaraciones en cuanto a las Tablas 1 a 3:

Exámenes BIAcore

30 Con el sistema BIAcore® de la razón social Pharmacia Biosensor se pueden seguir on-line las interacciones bioespecíficas. El principio de la medición se basa en un fenómeno óptico (resonancia de plasmón de superficie), el cual sufre la influencia de la masa unida a una película de oro. Expresado de manera simplificada, en el caso de este sistema se trata de una cromatografía de afinidad miniaturizada sobre la superficie de un sensor de oro. La cantidad de un ligando específico unido se puede representar fotográficamente en forma de una señal de resonancia (Chaiken, I.; Rosé, S.; Karlsson, R. (1992) Anal. Biochem. 201; 197 a 201. Karlsson, R. Altschuh, D.; van Regenmortel, M.H.V. (1992) Measurement of antibody affinity, en: Structure of Antigens; CRC Press (van Regenmortel, ed); Boca Raton, FL; 127 a 148).

1. Rastreo directo sobre laminina P1 inmovilizada

40 La laminina P1 se inmovilizó sobre un chip sensor conforme a las instrucciones del manual del usuario con una concentración de 200 µg/ml en acetato de Na 10 mM, pH = 4,0. Para la regeneración de la matriz de afinidad de la Lam-P1 se puede llevar a cabo un impulso doble con 4 µl de HCl 100 mM. La capa de laminina P1 es extremadamente estable y se puede utilizar durante 2 meses (> 300 análisis individuales) sin pérdida de calidad. Para el rastreo en busca de potentes anticuerpos se condujeron directamente 4 a 25 µl del sobrenadante del cultivo de las respectivas colonias celulares sobre la matriz de afinidad, al cabo de 1 a 5 minutos se puede reconocer la unión (fuerza relativa) en el RU y en la constancia de la señal. Esto permite una selección rápida y al mismo tiempo de fuerte expresión de los clones interesantes. Inyecciones sucesivas con diferentes sobrenadantes de cultivos sin regeneración intermedia hacen posible el rastreo de anticuerpos que se pueden unir al mismo tiempo a diferentes epítomos del antígeno.

2. Determinación de las subclases

55 Los sobrenadantes de hibridomas se condujeron sobre la capa de lam P1 del chip de BIAcore® tal como se ha descrito anteriormente. Tras la unión del anticuerpo (caudal de la muestra) se inyectaron después secuencialmente en cada caso 4 µl de anticuerpos de las subclases específicas anti-ratón. Un incremento de la señal es nuevamente la expresión de una unión recíproca. Con ello, en el espacio de 5 minutos es posible una clasificación unívoca de la subclase.

3. Determinación de la concentración

60 Para una unión selectiva y reversible de anticuerpos de ratón se puede inmovilizar sobre el chip sensor del BIAcore® un anticuerpo especial (Fc-específico Rabbit anti mouse (anti-ratón de conejo); RAM-Fc) con ayuda de un método estándar. Puesto que la señal del sistema de medida depende directamente de la masa del ligando unido, es posible llevar a cabo determinaciones de concentración, sobre todo cuando el material estándar y la muestra que se ha de analizar tienen pesos moleculares iguales. La determinación de la concentración de una proteína específica es

incluso posible en mezclas complejas, puesto que como en el ejemplo anterior por la especificidad de la unión sólo se capta en el chip sensor la masa del ligando deseado.

Con ayuda de un anticuerpo monoclonal bien caracterizado (MAK 238), existente en el laboratorio, se creó una curva estándar para la determinación de la cantidad de anticuerpos presente en los líquidos sobrenadantes del cultivo (= rendimiento de la síntesis del clon). A través de la curva estándar las señales promediadas a partir de determinaciones dobles de muestras desconocidas (sobrenadantes de cultivos) se pueden convertir por cálculo en concentraciones ($\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales). Para la elaboración de esta serie de mediciones tan complejas y largas, el sistema BIAcore se sirve de un programa de randomización de manera que se niegan las fuentes de fallos que se podrían producir por la solicitud de la matriz de afinidad o por los diferentes tiempos de permanencia.

4. Screening en cuanto a las propiedades de unión a la laminina humana

En virtud del tan solo escaso enriquecimiento de la laminina humana en la preparación (laminina carga I) no se pudo llevar a cabo ninguna inmovilización directa (como, por ejemplo, en el caso de Lam-P1). Por lo tanto, se tuvo que construir una matriz de afinidad que estuviera en condiciones de pescar la laminina a partir de la solución heterogénea.

Sobre el RAM-Fc inmovilizado (véase más arriba) se ligaron anticuerpos específicos de los sobrenadantes de los cultivos y, con ello, se crearon matrices de afinidad (no covalentes) para la laminina humana. Sobre estas capas específicas se pudo conducir la muestra de laminina. En el caso de un reconocimiento, se podía observar un nuevo incremento de la señal.

5. Determinación de las constantes de unión

Con el sistema BIAcore® es posible determinar cuantitativamente la unión de ligandos (Chaiken, I.; Rosé, S.; Karlsson, R. (1992) Anal. Biochem. 201; 197 a 201. Karlsson, R. Altschuh, D.; van Regenmortel, M.H.V. (1992) Measurement of antibody affinity, en: Structure of Antigens; CRC Press (van Regenmortel, ed); Boca Raton, FL; 127 a 148), puesto que la fase de asociación, el ajuste del equilibrio de unión y la fase de disociación se pueden representar como procesos separados en el tiempo. El software del instrumento hace posible una conversión relativamente sencilla de los datos de la medición en los correspondientes cálculos de tablas.

Para la determinación de las constantes de unión se tiene que conducir (por ejemplo) un anticuerpo específico (una purificación previa no es absolutamente necesaria) en varias diluciones sobre la matriz de afinidad. Durante la fase de asociación el programa proporciona en intervalos definidos por el usuario los valores de RU y la pendiente actual de la curva, de manera que es posible un trazado de la pendiente/R. La constante de asociación k_{as} se puede determinar si las pendientes de esta función para todas las concentraciones analizadas se relacionan con las actuales concentraciones presentes (en nM). En el experimento, la fase de disociación se prolonga extremadamente en el caso de la concentración máxima de anticuerpos. A partir del dato $\ln R1/Rn$ frente al tiempo se puede obtener la constante de disociación k_{dis} . La constante de equilibrio KD se obtiene a partir de la fórmula k_{as}/k_{dis} .

Tabla 1:

	Subclase	Unión de laminina humana (BIAcore)	Unión de laminina sérica pico 1 (de elevado peso molecular)	Unión de laminina sérica pico 2 (de bajo peso molecular)
A27/2/1	IgG 2a	534 RU	19,5 $\mu\text{g/ml}$ ⁽¹⁾	9,6 $\mu\text{g/ml}$ ⁽¹⁾
A9/2/1	IgG 2a	601 RU	20,5 $\mu\text{g/ml}$ ⁽²⁾	2,4 $\mu\text{g/ml}$ ⁽²⁾
A33/2/20	IgG 1	154 RU	12,3 $\mu\text{g/ml}$ ⁽²⁾	1,9 $\mu\text{g/ml}$ ⁽²⁾
1) Procedimiento IRMA con RIA-Ak (= IgG policlonal de conejo; base para el RIA-gnost®) como anticuerpo estratificado y A27/2/1 yodado.				
2) Procedimiento IRMA con A27/2/1 como anticuerpo estratificado y A9/2/1, A33/2/20 yodado.				

Tabla 2:

Propiedades físicas – constantes de unión			
A) Constantes de unión a una matriz de afinidad de Lam P1			
	A27/2/1	A9/2/1	A33/2/20
k_{as} (1/Ms)	2,972x10 ⁵	2,303x 10 ⁵	1,72x10 ⁵
k_{dis} 1/s)	6,71x10 ⁻⁶	8,699x10 ⁻⁶	1,28x10 ⁻⁶
KD (1/M)	4,43x10 ¹⁰	2,65x10 ¹⁰	1,35x10 ¹⁰
B) Constantes de afinidad a una matriz de afinidad de laminina humana			
	A27/2/1	A9/2/1	A33/2/20
k_{as} (1/Ms)	1,25x10 ⁵	4,54x10 ⁵	4,74x10 ⁴
k_{dis} 1/s)	en 30 min	no	medible I
KD (1/M)	-	-	-

Tabla 3:

Propiedades físicas – constantes de unión Constantes de unión a una matriz de afinidad de MAK A27/2/1			
	Lam-P1:	Laminina*	Laminina**
k_{as} (1/Ms)	$8,64 \times 10^3$	$1,14 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$
k_{dis} 1/s)	$2,24 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-4}$
KD (1/M)	$3,85 \times 10^{-7}$	$7,49 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-9}$
* Laminina humana purificada tal como se describe en Métodos			
** Laminina humana purificada por cromatografía de afinidad en un cóctel de anticuerpos monoclonales			

A partir de las tres tablas se deduce que los tres anticuerpos monoclonales poseen unas propiedades de unión muy buenas, sobre todo que los anticuerpos se caracterizan por una unión muy fuerte al antígeno inmovilizado. En el caso de la capa de laminina, por ejemplo, no se puede detectar una disociación en ninguno de los anticuerpos durante el espacio de tiempo del análisis (30 min). No obstante, si se conduce antígeno disuelto, por ejemplo sobre una capa de A27/2/1, entonces la asociación tiene lugar con una cinética rápida invariable ($k_{as} 1,2 \times 10^5$ /Ms). Pero entonces se anexiona una clara fase de disociación, de manera que se puede determinar una constante de equilibrio de aproximadamente 1×10^9 para la unión de la laminina.

De manera interesante, las constantes de unión a la Lam P1 se diferencian en el factor 1000 en función de que la LamP1 se presente inmovilizada (localmente en alta concentración) o que tenga que ser ligada a partir de la solución. Este efecto podría ser la base para el reconocimiento exclusivo del pico de alto peso molecular (laminina sérica intacta) en el suero humano (véase más abajo).

Tabla 4

Estrategia del rastreo para anticuerpos mk. anti LamP1/Laminina		
Etapas de rastreo	Método de ensayo/criterio de selección	Selección
Inmunización	Determinación del título	
Fusión → hibridomas	Rastreo con ELISA en cuanto a Lam P1 CRITERIOS DE SELECCIÓN: Reconocimiento de Lam-P1 en ELISA (altura de los OD) Crecimiento de los clones en el cultivo celular	150 pos. clones
1. Selección		56 pos. clones
Cultivo en placas para cultivo de 24 pocillos	Rastreo con ELISA en cuanto a Lam-P1 y respecto a un extracto de placenta humana enriquecido con laminina CRITERIOS DE SELECCIÓN: fuerte unión a Lam-P1 y/o reacción positiva sobre laminina	
2. Selección		18 pos. clones
Primera caracterización bioquímica	Determinación de las subclases con rastreo BIAcore (exclusión de IgM) con electroforesis en gel SDS, Western-Blot, tinción inmune CRITERIOS DE SELECCIÓN: Reacción con laminina no reducida y/o con laminina reducida	
Individualización de los clones positivos (por clon aprox. 10-20 subcolonias)		
Segunda caracterización bioquímica	Determinación de las subclases con rastreo BIAcore (exclusión de IgM) con electroforesis en gel SDS, transferencia Western, tinción inmune CRITERIOS DE SELECCIÓN: Reacción con laminina no reducida y/o con laminina reducida	

Estrategia del rastreo para anticuerpos mk. anti LamP1/Laminina		
Etapas de rastreo	Método de ensayo/criterio de selección	Selección
3. Selección		11 pos. clones
Caracterización con BIAcore	Examen de la unión de Lam-P1 (fuerza relativa) Examen de la unión de laminina (fuerza relativa) Determinación de las subclases (unidades de tipos de diferentes clones valoración cualitativa de las cinéticas de asociación y disociación CRITERIOS DE SELECCIÓN: Unión de máxima fuerza a Lam-P1 Unión a laminina de extracto de placenta Exclusión de IgM (en 2 casos) clones con máximo rendimiento de síntesis Unión simultánea al antígeno con otros anticuerpos monoclonales	
4. Selección		5 pos. clones
Reacción con suero	Detección de la forma sérica de alto peso molecular (RIA) ¿Alta afinidad al antígeno sérico"? (RIA) Primera etapa del desarrollo de los análisis (Tabla 5)	
5. Selección		3 pos. clones
Tercera caracterización bioquímica	Electroforesis, transferencia Western, tinción inmune Determinación de las constantes de unión con BIAcore Elaboración de las condiciones de purificación para anticuerpos monoclonales	

Tabla 5

Primera etapa del desarrollo de los ensayos		
Reconocimiento del antígeno sérico		Ensayos de recubrimiento
Con ayuda de un procedimiento de tubo recubierto sobre la base del antisuero policlonal de RIA-gnost® LamP1. Los 5 anticuerpos monoclonales seleccionados (4ª selección) se emplearon como segundos anticuerpos yodados.	Producción y purificación de los anticuerpos monoclonales a escala de 1-5mg	Diferentes tubitos RIA se recubrieron con los anticuerpos seleccionados (4ª selección), como sonda para la unión superficial se utilizó LamP1 yodado. Optimación del tampón de recubrimiento y de las condiciones de bloqueo
Antígenos de ensayo: laminina sérica purificada (alto p. mol. y formas de bajo p. mol.); LamP1 estándar de RIA-gnost® LamP1; Sueros normales Criterios de selección para ensayos con tubo recubierto: Reconocimiento de LamP1 estándar, suero laminina (alto p. mol.) clara reacción con suero normal Autenticidad de la dilución del ensayo	Producción de A27/2/1 y A9/2/1 (escala 100mg)	→ mejor candidato como anticuerpo estratificado = A27/2/1 B2 Optimación de los tiempos de incubación, intervalos de incubación, tampón, volumen sérico para 3 variantes con tubo recubierto

ES 2 459 290 T3

Continuación de las condiciones de ensayo para tres procedimientos con tubo recubierto

Anticuerpos estratificados	= A27/2/1
Segundo anticuerpo	= A9/2/1 B2
	= A33/2/20
	= IgG policlonal anti LamP1

MEDICIONES DEL ENSAYO con el procedimiento de los tres tubos recubiertos

- 5 Determinación de la distribución del antígeno en sueros normales
Determinación de los contenidos normales
Ensayos en cuanto a reactividades cruzadas
Aplicación en distintas indicaciones

Tabla 6

Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti laminina P1												
La determinación de la concentración y la determinación de las subclases se efectuó con BIAcore. Los valores en la columna "ELISA" se indican como OD a 405 nm. En las columnas "Blot" -SH significa no reducido, +SH reducido, + + + reacción muy potente, + + reacción potente, + reacción clara, - ninguna reacción. Para los estudios de unión en el BIAcore se emplearon respectivamente dos cargas de laminina P1 (C. 1, C. 2) y laminina (C. 1, C. II). En la columna "pares" se indican los anticuerpos o, respectivamente, clones que con los anticuerpos especificados en la columna 1, se pueden unir al mismo tiempo a la laminina P1.												
Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti laminina P1												
Anticuerpos	Conc. µg/mg	Subtipo	ELISA		Borrón		BIAcore			Lamina H		Pares
			Lam-P1:	Laminina (S)	Laminina - SH	Laminina + SH	C.1,25µl	Lam P1 C. 2,4µl	C. 2,25µl	C.1	C. 2	
27/1/1	10		1.57	1.061	+++	-		191 RU	584 RU			A9/1/7 A24/1/13; A25/1/2
A 27/1/2	20.9		1.224	0.942					638 RU			
A 27/1/7	10.1 (5.2)	IgG2a	1.488	1.058				231 RU	613 RU			A50/1/4
A 27/1/8	12.8	IgG2a	1.503	1.038	+++	++			650 RU		291	
A 9/1/7	23.6	IgG2a	1.544	1.147	+++	débil		514 RU	1050 RU		332	A27/1/7 A25/1/2 A50/1/4
A 9/1/12	12.1	IgG2a	1.289	0.906				418 RU	774		300	
A 9/1/4	11.3		1.556	1.046					794		309	
A 9/1/9	31.0		1.559	1.141					(1:3)661		323	
A 24/1/13	10.8	IgG2a	1.319	1.628	+++	débil	833 RU	345 RU	737 RU	+		A33/1; A27/1/7 A25/1/2 A50/1/4
A 24/1/5	21.3		1.266	0.922							280	A50/1/5 A33/1/1 A50/1/4
A 24/1/23	21.5		1.782	0.854							276	
A 25/1/2		IgG2a:IgG1	2.079	2.125	++(1:500)	-	410 RU	443 RU	331/1/10	+	-	A24/1/6; A27/1/1 A50/1/4
A/35/1/2	12.9	IgG1	0.816	0.01	débil	+	148 RU	48 RU	129 RU			
A/33/1/3	14.1	IgG1:IgM	1.004	0.122				143 RU	404 RU			
A 33/1/1	7	IgM	1.214	0.02	débil	-		161 RU				
A 6/1/7	7	IgM	1.386	1.517	++	débil	622 RU	272 RU		+		
A 6/1/8	7	IgM:IgG1	1.632	1.46			640 RU	275 RU	495 RU			

A 16/1/1	6.0	IgG1	0.561	0.628	débil	-		26 RU	77 RU			
A 16/1/6	8.6	IgG1	0.76	0.592				35 RU	103 RU			
A 41/1/7	9.1	IgG1	0.327	0.416	débil	-		6 RU				
A 50/1/4	16.3	IgG1	1.289	-				681 RU	947 RU	-		A9/1/7 A24/1/13; A27/1/8 A24/1/13; A28/1/1
A 50/1/5	16.6	IgG1	1.406	-	débil		261 RU	157 RU	185 RU	-		
A 48/1/5	18.5	IgG1	0.33	-				241 RU	372 RU			
A 46/1/12	38.5	IgG1	0.319	-				380 RU	576 RU	-		A9/1/7 A24/2/2; A27/1/8 A25/1/2

Tabla 7

Criterios decisivos definitivos para la selección de clones para el desarrollo de un ensayo											
Recubrimiento	Sándwich con poli K4 (1/93)		Estándar ng/ml	cpm	% unión	Lam C.I Ug/ml	Suero P1 ug/ml	Suero P2 ug/ml	Suero humano	cpm	
	Diluc./µg/ml										
28/1/1 del 7.6.91	1:20	49	S0	70		10,6	14	1,7	200 ul 300/90	699	
			S1	5632					Suero ensayo	1217	
			S4	29721					52/89	843	
			S7	79393	51						
24/2/2 (075)	1:10	12,6	S0	116		5,7	9,6	1,6	200 ul 300/90	145	
			S1	4073	3				Suero ensayo	489	
			S4	22989	16				52/89	172	
			S7	58777	42						
27/2/1 (071)	1:10	190	S0	167		19,8	9,9	1,6	200 ul 300/90	11621	
			S1	5155					Suero ensayo	19554	
			S4	30580					52/89	15602	
			S7	71761		46					
	1:30	65	S0	193					300/90 (100ul)	11117	
			S1	5623							
			S4	29596							
			S7	66547	47						
									200 ul		
27/2/1 (074)	1:10	26	S0	66		19,3	9,4	1,7	300/90	9234	
			S1	4931	3				Suero ensayo	13258	
			S4	25524	18				52/89	13843	
			S7	63453	45						
									200 ul		
9/2/1 (072)	1:10	10	S0	91		12,7	11	1,3	300/90	1480	
			S1	5198	3,6					2995	
			S4	28286	20					1999	
			S7	63388	45						

Criterios decisivos definitivos para la selección de clones para el desarrollo de un ensayo									
	Sándwich con poli K4 (1/93)								
"cpm estándar, respec. "Lam Cj"	comparación del reconocimiento estándar RIAgnost								
"Sero P1, Sero P2"	unión a la laminina, que fue purificada como se describe en Métodos								
"Sero humano"	antígeno sérico de alto peso molecular, respec. antígeno sérico de bajo peso molecular; purificado a partir de ≈ 20 ml de suero humano normal								
	Unión del antígeno en sueros humanos de ensayo.								
	Los clones A28/1/1 y A24/2/2 no son adecuados en virtud de la insuficiente reacción.								

Tabla 8

Reacciones cruzadas									
Marcador	A9/2/1 B2				A33/2/20				
Antígeno	Concentración de ensayo	Recuentos	% de unión	Concentración calculado	recuentos	% de unión	Concentración calculado		
LamP1	0	289	0,18		102	0,09			
Estándar	0,17/0,037	4140	2,6		1606	1,41			
	1,43/0,31	32050	20,2		13066	11,5			
	12/2,64	142523	89,9		51264	45			
colágeno 1 (Chemicon)	5	607	0,38		807	0,71			
Colágeno III (Chemicon)	1	340	0,21		287	0,25			
Colágeno IV (Chemicon)	5	331	0,21		138	0,12			
Colágeno V (Chemicon)	1	316	0,2		114	0,1			
Colágeno VI (Chemicon)	5	527	0,33		120	0,11			
Fibronectina (Chemicon)	1	333	0,21		114	0,1			
Colágeno V (Chemicon)	5	614	0,39		241	0,21			
Colágeno VI (Chemicon)	1	455	0,29		232	0,2			
Colágeno VI (Chemicon)	6,6	378	0,24		262	0,23			
Fibronectina (Chemicon)	1,32	533	0,34		161	0,14			
Fibrinógeno (Sigma)	5	413	0,26		141	0,12			
Col.VI a3Nt Dr. Timpl	1	463	0,29		148	0,13			
NC 1	5	367	0,23		171	0,15			
Aislado propio	1	279	0,18		151	0,13			
7S (DE10)	3,3	349	0,22		148	0,13			
Aislado propio	0,66	381	0,24		130	0,11			
7S (DE6)	5	330	0,21		122	0,11			
Aislado propio	1	407	0,26		174	0,15			
EHS-LN	5	303	0,19		159	0,14			
Dr. Timpl	1	311	0,2		132	0,12			
EHS-LamP1	5	271	0,17		160	0,14			
Dr. Timpl	1	336	0,21		230	0,2			
Laminina (Chemicon)	7	279	0,18		186	0,16			
Merosina (Chemicon)	1,4	306	0,19		250	0,22			
	6,8	466	0,29		270	0,24			
	1,36	381	0,24		282	0,25			
	6,73	18210	11,5	0,176 µg/ml	4009	3,52	0,095 µg/ml		
	1,35	4290	2,7	0,039 µg/ml	974	0,86			
	5	127867	80,7	2,05 µg/ml	25468	22,3	0,68 µg/ml		
	1	35812	22,6	0,36 µg/ml	5632	4,9	0,13 µg/ml		

Tabla 9:

Valores normales:			
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml
RIA-gnost® Lam-P1	126	1,32 ± 0,18	1,31
A27/2/1 - J A9/2/1	23	0,864 ± 0,212	0,849
A27/2/1-A33/2/20	24	0,073 ± 0,038	0,065

Tabla 10:

Cirrosis biliar primaria					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	42	2,28 ± 0,57	2,41	1,72	
A27/2/1 - J A9/2/1	42	1,98 ± 0,96	2,03	2,29	0,49
A27/2/1-A33/2/20	42	0,45 ± 0,4	0,34	6,16	0,28

5 Tabla 11

Cirrosis hepática tóxica alcohólica					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	58	3,14 ± 0,98	3,15	2,38	
A27/2/1 - J A9/2/1	58	3,71 ± 2,08	3,19	4,29	0,69
A27/2/1-A33/2/20	58	0,9 ± 0,59	0,69	12,3	0,21

Tabla 12

Hepatitis crónica activa					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	26	2,20 ± 0,58	2,45	1,7	
A27/2/1 - J A9/2/1	26	2,35 ± 1,09	2,16	2,7	0,26
A27/2/1-A33/2/20	22	0,53 ± 0,45	0,38	7,3	0,05

10 Tabla 13

Cirrosis hepática descompensada					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	23	2,71 ± 1,29	2,26	2,05	
A27/2/1 - J A9/2/1	19	3,05 ± 1,77	2,84	3,53	0,93
A27/2/1-A33/2/20	19	0,664 ± 0,556	0,38	9,14	0,41

Tabla 14

Cirrosis hepática de origen indeterminado					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	15	3,25 ± 1,03	3,18	2,46	
A27/2/1 - J A9/2/1	14	4,52 ± 1,99	4,48	5,23	0,43
A27/2/1-A33/2/20	14	1,09 ± 0,564	1,14	14,9	0,8

Tabla 15

Cirrosis hepática posthepatitis					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Incremento comparado con valor normal	Correlación con RIA- gnost® r ²
RIA-gnost® Lam-P1	26	2,96 ± 1,03	2,93	2,24	
A2712/1-A9/2/1	25	2,82 ± 1,3	2,29	3,26	0,35
A2712/1-A3312120	25	0,583 ± 0,452	0,45	7,99	0,28

Tabla 16

Enfermedades cancerígenas			
A. Suero de un paciente con carcinoma hepatocelular			
	RIA-gnost® Lam-P1	A27/2/1 - J A9/2/1	A27/2/1-A33/2/20
Laminina E/ml	3,4	3,6	0,45
Incremento	2,6	4,2	6,2
B. Paciente con cáncer de pulmón			
Paciente	RIA-gnost® Lam-P1	A27/2/1 - J A9/2/1	A27/2/1-A33/2/20
	E/ml	E/ml	E/ml
MC	3,01	1,81	0,183
JV	2,7	1,25	0,054
EU	2,8	2,4	0,200

Tabla 17

Diabetes					
	n'	Valor medio E/ml	Mediana E/ml	Discrepancia comparada con valor normal	Correlación con RIA-gnost® r^2
RIA-gnost® Lam-P1	78	1,70 ± 0,30	1,66	1,3	
A27/2/1 - J A9/2/1	80	0,73 ± 0,37	0,58	0,84	0,61
A27/2/1-A33/2/20	80	0,057 ± 0,064	0,039	0,53	0,05

- 5 Se examinaron los sueros de 80 diabéticos asignados de forma estacionaria (32% tipo I, 68% tipo II) con una duración de la diabetes de 11-14 años (Stracke, H.; Wiek, K.; Günzler, V.; Federlin, K. (1993) Die Medizinische Welt 44; 383 a 385), en los cuales se diagnosticó quiropatía (36%), retinopatía (48%), neuropatía (66%) y nefropatía (39%).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal con especificidad por proteínas de la familia de las lamininas y el fragmento de laminina P1 el cual se puede preparar a partir de placenta humana por digestión con pepsina, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal se une al fragmento de laminina P1 y a laminina nativa, intacta, con aproximadamente la misma afinidad, estando excluido un anticuerpo que es producido por la línea celular de hibridoma DSM ACC2181, DSM ACC2180 o DSM ACC2182, caracterizado porque
 - a) animales vertebrados, no humanos, se inmunizan con el fragmento de laminina P1, el cual se puede preparar a partir de placenta humana por digestión con pepsina,
 - b) se obtienen linfocitos de los animales vertebrados inmunizados y se fusionan con células de mieloma,
 - c) se seleccionan los híbridos en cuanto a la presencia del anticuerpo con las propiedades citadas y se clonan, y
 - d) a partir de estos clones se obtiene el anticuerpo,
 en el que el anticuerpo une las estructuras plegadas nativas de los dominios de laminina P1 de la laminina y en el que el procedimiento se caracteriza porque el anticuerpo se forma por un hibridoma que resulta por fusión de células de una línea celular de mieloma y linfocitos de un animal vertebrado no humano inmunizado con fragmento de laminina P1 de placenta humana y a continuación se selecciona y porque el anticuerpo formado muestra una propiedad de unión a laminina humana purificada y a la forma de elevado peso molecular de la laminina obtenida a partir de suero humano.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal se caracteriza por la capacidad de unirse, a pares, con otro anticuerpo conforme a la reivindicación 1.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal se le clasifica en la subclase IgG 2a.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal se le clasifica en la subclase IgG 1.
5. Procedimiento para la preparación de una línea celular de hibridoma, la cual produce un anticuerpo conforme a la definición en una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque
 - a) se fusionan células de una línea celular de mieloma y linfocitos de un animal vertebrado, no humano, inmunizado previamente con laminina P1 y
 - b) se seleccionan híbridos después de que el anticuerpo producido por el híbrido presente una buena propiedad de unión a la laminina de placenta humana purificada y a la forma de elevado peso molecular de la laminina obtenida a partir de suero humano.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los linfocitos se extraen de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con laminina P1, y la línea celular de mieloma es la línea celular P3X63AG8.653 del mieloma de ratón.
7. Procedimiento para la determinación inmunológica de laminina nativa utilizando un anticuerpo estratificado fijado de forma adhesiva o covalente a un material de soporte y un segundo anticuerpo marcado, el cual reconoce el antígeno unido al anticuerpo estratificado, caracterizado porque el anticuerpo estratificado es un anticuerpo monoclonal conforme a la definición de una de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Procedimiento para la determinación inmunológica de laminina nativa utilizando un anticuerpo estratificado fijado de forma adhesiva o covalente a un material de soporte y un segundo anticuerpo marcado, el cual reconoce el antígeno unido al anticuerpo estratificado, caracterizado porque el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo monoclonal conforme a la definición de una de las reivindicaciones 1 a 4.

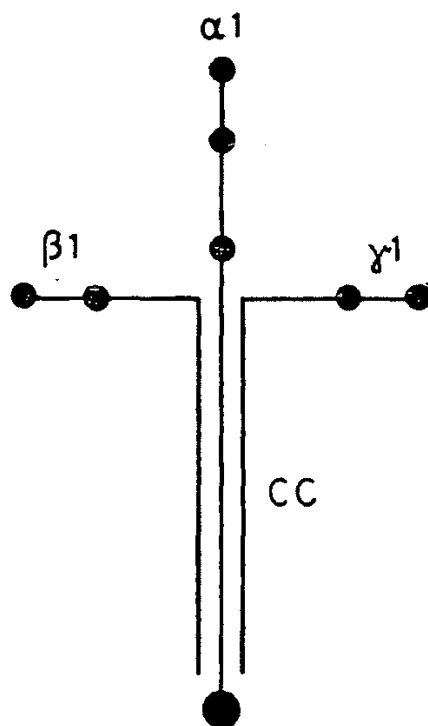


Fig. 1a

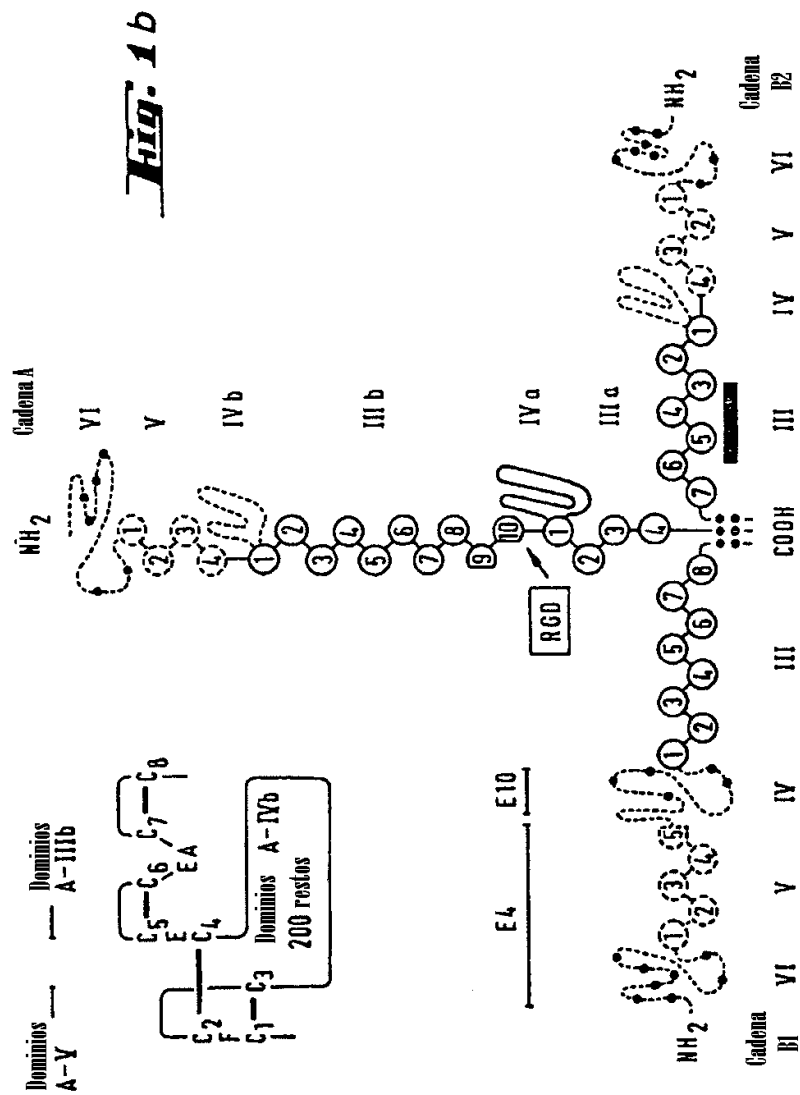


Fig. 2

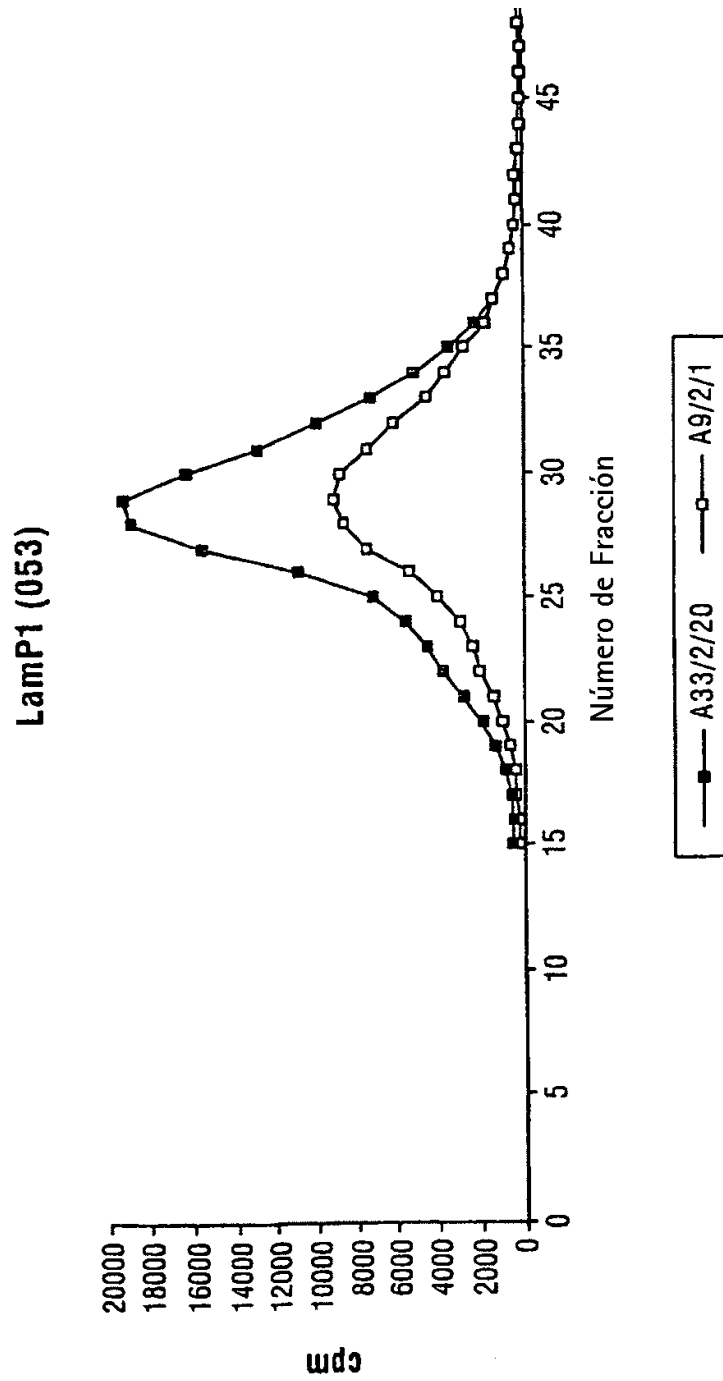


Fig. 3

Laminina Ch II (054)

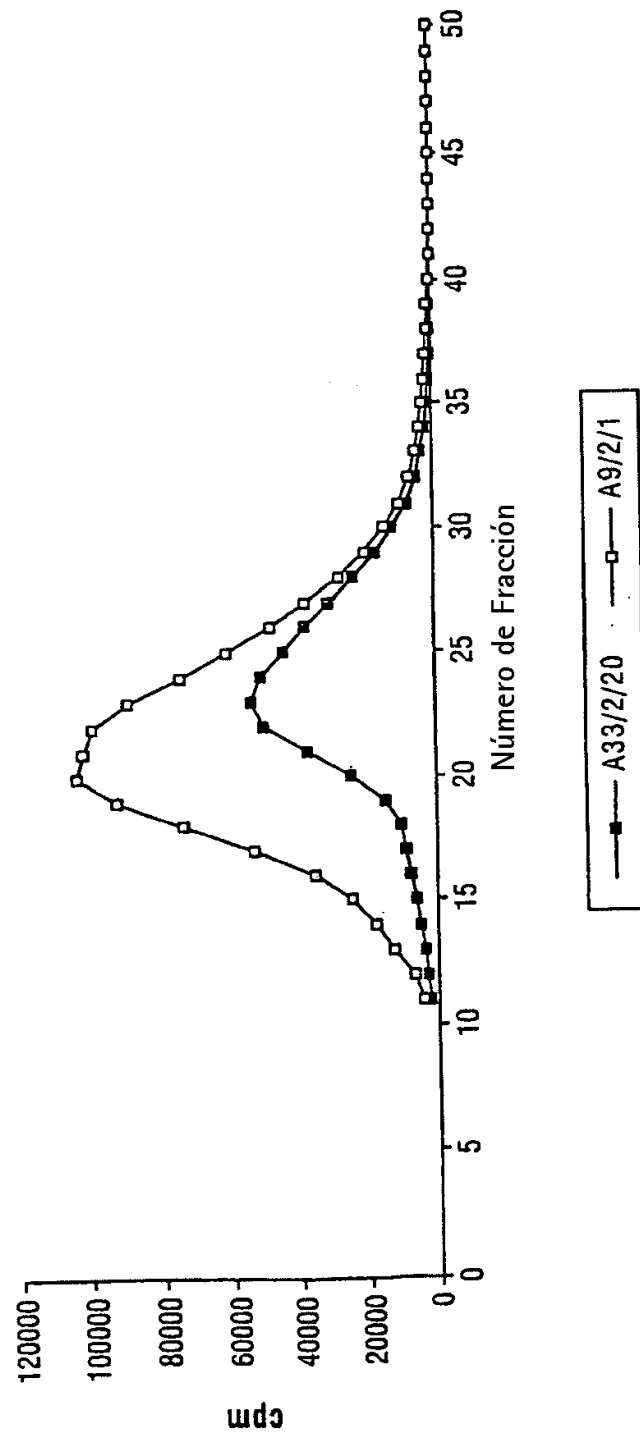


Fig. 4

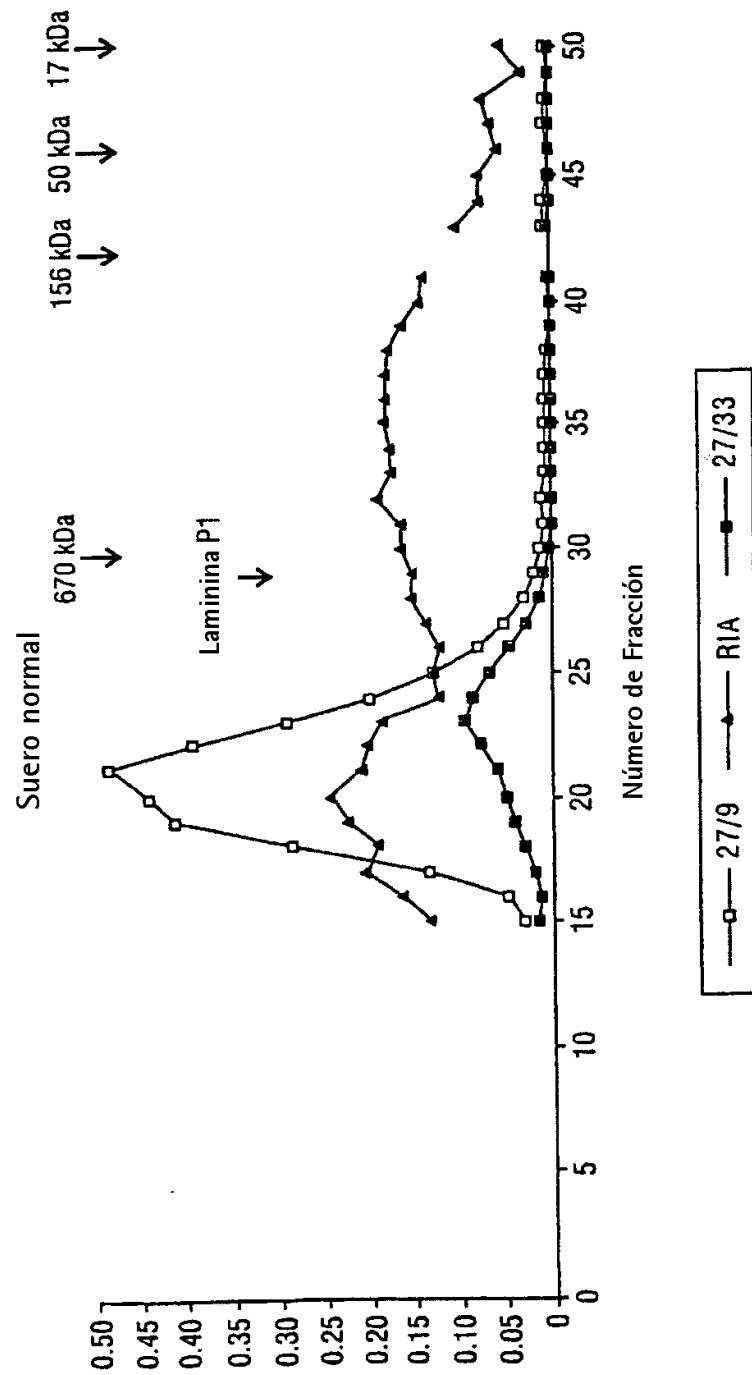


Fig. 5

Suero 3114 (060) ALC

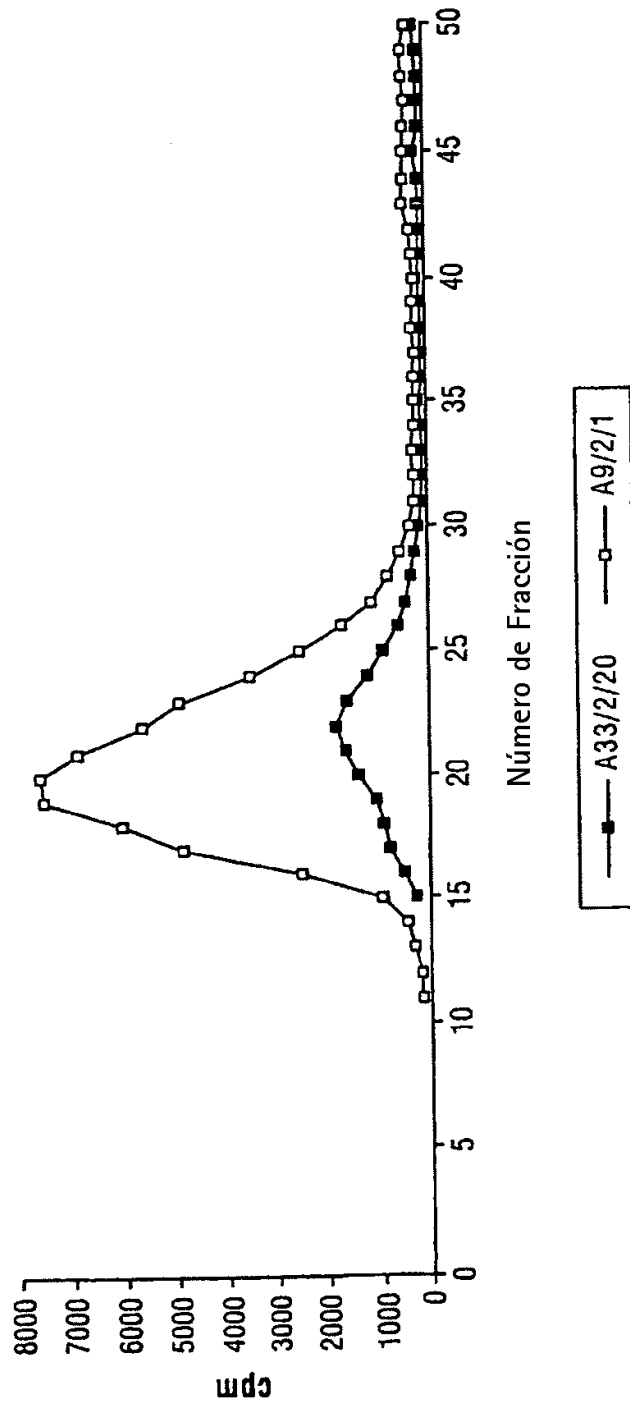


Fig. 6

Suero 2026 (058) PBC

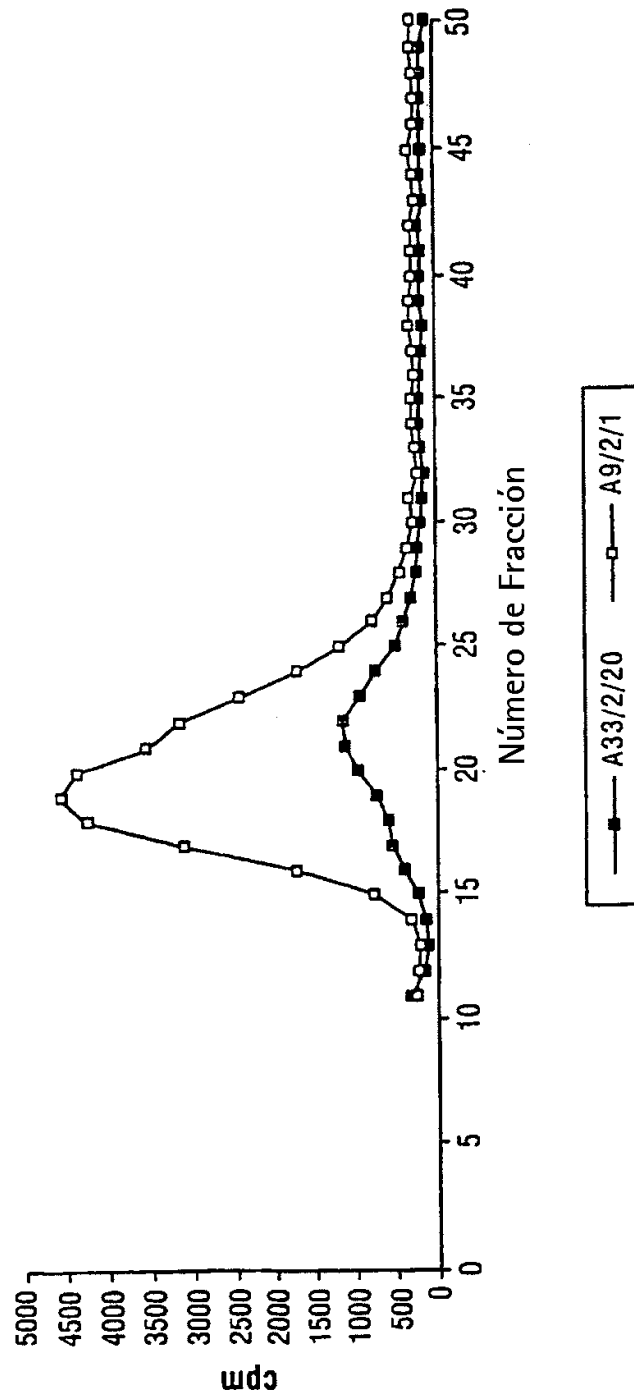


Fig. 2

Suero 4065 (056) CAH

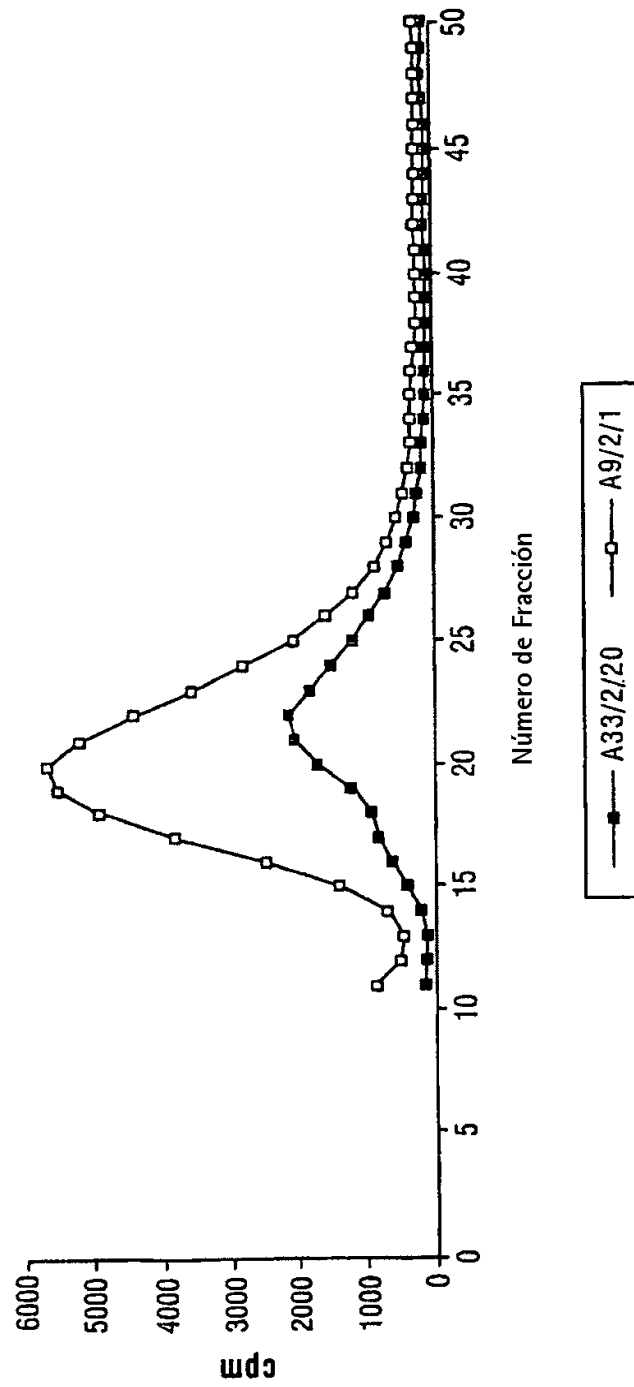


Fig. 8

