



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 224 231**

⑤① Int. Cl.⁷: **C07K 16/26**
G01N 33/72
A61K 39/395

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97916700 .4**

⑧⑥ Fecha de presentación: **27.03.1997**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0889907**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.1999**

⑤④ Título: **Anticuerpos monoclonales que se unen a la hormona del crecimiento humana (hGH).**

③⑩ Prioridad: **29.03.1996 SE 9601231**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

⑦③ Titular/es: **Pharmacia Spain S.A.**
Carretera de Rubi, 90-100
08190 Sant Cugat del Vallés, Barcelona, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑦② Inventor/es: **Hansson, Yngve, Elof;**
Kremer Baron, Leonor;
Martínez Alonso, Carlos;
Mellado García, José Mario y
Rodríguez Frade, José Miguel

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 224 231 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).

ES 2 224 231 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales que se unen a la hormona del crecimiento humana (hGH).

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse específicamente a la variante de la hormona humana del crecimiento con un peso molecular de 20 kDa, denominada en el presente texto hGH 20K.

Este anticuerpo monoclonal no tiene una unión sustancial a la hGH de peso molecular 22 kDa.

10 También se refiere al uso de este anticuerpo monoclonal para la medida del hGH 20K, especialmente en fluidos corporales.

Los anticuerpos pueden usarse para la detección y cuantificación de hGH 20K, especialmente en suero.

15 Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo ha sido depositada bajo el número DSM ACC 2254 el 28 de febrero de 1996.

Introducción

20 La hormona humana del crecimiento (hGH) es un polipéptido de cadena simple de 22 kDa de peso molecular, compuesta por 191 aminoácidos con dos enlaces disulfuro intra-cadenas, producida por la glándula pituitaria anterior (1,2). Sin embargo, la hGH circulante es una mezcla compleja de formas moleculares diferentes, algunas de las cuales son derivadas de la pituitaria, tales como hGH 22K y hGH 20K, un polipéptido de cadena simple de 20 kDa de peso molecular de hormona humana del crecimiento, mientras que otras son segregadas por la placenta durante el embarazo (hGH-V). Además, otras hormonas trópicas, lactógeno placentario (hPL) y prolactina, muestran una significativa identidad de secuencia con la hGH. También se han descrito otras variantes moleculares de la hGH derivadas de modificaciones prost-traduccionales tales como desamidación, acilación, glicosilación y oligomerización (3).

30 La hormona humana del crecimiento es codificada por dos genes, hGH-N y hGH-V, que están arracimados en el cromosoma 17 junto con el gen del lactógeno placentario (hPL) altamente homólogo (4,5). El producto principal del gen hGH-N expresado en la pituitaria es la hGH 22K de 191 aminoácidos.

35 Un producto secundario de este gen es hGH 20K, derivada por ajuste de mRNA alternativo, al que le faltan 15 restos en la cadena de polipéptido, desde los aminoácidos 32 a 46 (6,7). Esta hGH 20K representa del 5 al 10% de la hGH de la pituitaria (3) y sus propiedades biológicas están aún por definir. Aunque realmente comparte algunas funciones en la isoforma 22K, también muestra actividades específicas. Así, la hGH 20K no se une a los receptores de hGH en el hígado humano (8) o al menos muestra una unión decreciente (9) y tiene menos actividad promotora del tipo de la insulina (10). La isoforma 20K compite con la hGH por la unión a receptores de la glándula mamaria de conejo, indicando que su efecto es más parecido a lactógeno que a somatógeno, incluso aunque favorece el crecimiento en la 40 rata hipofisectomizada (11), véase también el documento EP 587 427.

45 La hGH 20 K se aclara a una velocidad más lenta que la hGH, y esta prolongada persistencia de la hGH 20K en la circulación puede contribuir a su bioactividad *in vivo*, más alta de lo esperado (Baumann *et al.*, *Endocrinology*, vol. 117, n° 4, 1309-13, 1985).

En el documento EP 587 427 se describe un procedimiento para producir hGH 20K por un método recombinante.

50 A pesar de la importancia clínica de esta familia de hormonas peptídicas, hay poca información acerca de las concentraciones de las isoformas circulantes o de la contribución relativa de cada forma molecular de la mezcla compleja. Ensayos selectivos para definir la concentración de hGH 22K y hGH 20K serían valiosos tanto para diagnóstico como para investigación básica (12, 13, 14). Herramientas tales como anticuerpos monoclonales (mAb) que bloquean específicamente el efecto de estas proteínas podrían ser de gran interés para ayudar a entender sus acciones biológicas específicas.

55 Se ha sugerido que la cantidad y la relación entre hGH 22K y hGH 20K en circulación podrían ser de importancia para enfermedades y estados patológicos especiales tales como diabetes, acromegalia, enfermedades hepáticas y/o renales crónicas, y por tanto es muy necesario un método específico y preciso para medir la 20kDa.

60 En la actualidad no existe ningún método basado en el uso de un mAb específico para hGH 20K, para la detección específica y cuantificación. Se han hecho algunos intentos de producir mAbs específicos para hGH 20K con el propósito de desarrollar inmunoensayos para hGH 20K, pero sin éxito. Puede hacerse referencia a F. Gomez *et al.*, *J. of Immunoassay*, 5 (364), 145-57 (1984). En la página 155, se afirma: "Dado que la importancia patofisiológica exacta de la 20K GH es aún en gran medida desconocida, encontramos apropiado desarrollar un inmunoensayo para la misma, obteniendo primero anticuerpos monoclonales anti hGH 20K con una elevada especificidad. Sin embargo, 65 no pudieron obtenerse hibridomas estables segregantes de anticuerpos anti 20K específicos a pesar de la inmunización selectiva de los animales con un preparado de la variante altamente purificado".

Bo Dinesen, en *Hormone Research*, vol. 36, n° 1, 1991, 11-16, discute aspectos inmunológicos de ensayos de

GH, pero como una discusión general acerca de la ventaja del ensayo selectivo para determinar la concentración individual de distintas formas de ajuste de GH, como 22k y 20K. No se describe ningún mAb específico para 20K. Frankenne F. *et al.*, en J. Clin. Endocrinol. Metab., 1988, junio 66(6): 1171-80, demuestran mAbs que reconocen diferentes epítomos, pero no se describe ningún mAb específico para 20K. Aston *et al.*, en Mol. Immunol. 1985, Mar 22(3):271-5, describen anticuerpos monoclonales contra la hormona humana del crecimiento que pueden distinguir entre formas pituitarias y de ingeniería genética, y así se produjeron anticuerpos para poder discriminar entre GH de metionina NH2-terminal recombinante y GH derivada de la pituitaria, pero no se describe ningún mAb que sea específico para hGH 20K.

Así pues, durante mucho tiempo ha existido la necesidad de anticuerpos hGH 20K con alta especificidad que pudiesen ser usados en un método específico y preciso para medir la hGH 20K.

Tal anticuerpo podría también ser usado para aplicaciones terapéuticas cuando se bloquea la actividad biológica de hGH 20K.

Los autores han encontrado ahora una solución a la necesidad de detección y cuantificación de hGH 20K, al producir un mAb específico para hGH 20K. Este mAb ha sido usado con éxito para la detección específica de esta hormona en diferentes tipos de ensayos, y también se ha encontrado que bloquean específicamente su actividad biológica. Por esta razón es también útil para estudiar la actividad biológica de esta hormona y analizar su importancia biológica.

En ejemplos específicos, los autores describen la producción y caracterización de este mAb. Como anticuerpos comparativos, los autores describen también anticuerpos monoclonales específicos para hGH 22K y uno que reconoce tanto hGH 20K como hGH 22K.

25 Leyendas de las figuras

Figura 1 (A-C). Inhibición de la unión mAb-¹²⁵I-hGH (20K o 22K) con rhGH- 22K, hGH-20K, hGH-V, hPL y hPRL sin marcar. Las figuras corresponden a mAb hGH- 33 (Figura 1 A), hGH-12 (Figura 1B) y hGH-25 (Figura 1C).

Figura 2 Ensayos de captura de tipo *sándwich* para la detección específica de isoformas de hGH. hGH-22K (Figura 2A) y hGH-20K (Figura 2B).

Figura 3 Estimulación del crecimiento de células Ba/F3 quiméricas transfectadas con hGHR/G-CSF en respuesta a hGH-22K y 20K.

Figura 4 Bloqueo de anticuerpo monoclonal de la actividad de hGH 22K y 20K en células trasfectadas Ba/F3.

Figura 5 respuesta a la dosis de hGH 20K y 22K añadidos a un *pool* de suero normal humano.

40 La invención

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales que son específicos contra la hormona humana del crecimiento (hGH) con peso molecular 20 kDa (hGH 20K), que tienen una afinidad para hGH 20K de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferentemente de al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y más preferentemente más de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, según determinan los autores y como se describe en la parte experimental.

Los anticuerpos reivindicados pueden unirse a la hormona humana del crecimiento (hGH) con peso molecular 20 kDa (hGH 20K) presentando reacción cruzada con la hGH de peso molécula 22 kDa menos de un 5%, preferentemente menos de un 1%. La reactividad cruzada con hGH-V, lactógeno placentario y prolactina debe ser pequeña y preferentemente inferior al 5%, más preferentemente inferior al 1%, como se determina en la parte experimental.

También las hormonas que siguen han sido ensayadas en relación con la reactividad cruzada y muestran menos del 5%, e incluso menos del 1%, de reactividad cruzada: hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona estimuladora del folículo (FSH) y hormona estimuladora del tiroides (TSH).

Este anticuerpo monoclonal puede usarse para medir la hGH 20K p. ej. en fluidos corporales tales como suero, plasma, sangre, saliva, orina, líquido linfático, etc. El anticuerpo de la invención puede usarse para la determinación por inmunoensayo de hGH 20K en muestras que contienen esta hormona. Los diversos formatos de inmunoensayo son bien conocidos en la técnica y comprenden las etapas de:

1) poner en contacto una muestra que contiene hGH 20K con el anticuerpo de la invención, para formar un complejo entre el anticuerpo y la hGH 20K, en una cantidad que está relacionada con la cantidad de hGH 20K presente en la muestra, y

2) determinar la cantidad de complejo formado de una manera ya conocida, y relacionar la cantidad encontrada con la cantidad de hGH 20K presente en la muestra.

Los inmunoensayos pueden ser heterogéneos u homogéneos, y competitivos o no competitivos (*sándwich*). Los

ES 2 224 231 T3

diversos formatos usan en muchos casos reactivos inmunológicos marcados, en este caso hGH 20K o anticuerpo que se une a hGH 20K o anticuerpo que se une a hGH 20K marcado con enzimas, isótopos, biotina, fluoróforos, cromóforos, etc. (por ejemplo Ig anti-ratón) para facilitar la determinación de la cantidad de complejo formado.

5 El anticuerpo reivindicado puede acoplarse directamente a una fase sólida o indirectamente a través de otro anticuerpo unido al anticuerpo reivindicado. El anticuerpo marcado podría también usarse en forma soluble.

Algunos formatos pueden hacer uso de agentes de precipitación, tales como antisueros y anticuerpos unidos a una fase sólida.

10 El anticuerpo reivindicado puede usarse en un ensayo multianalítico, p. ej. para la determinación de diferentes isoformas de hGH.

15 La detección de hGH 20K en tejidos de especies diferentes (p. ej. monos, conejos, perros, ratas) por tinción inmunohistoquímica, es un uso sugerido.

El anticuerpo monoclonal reivindicado puede también usarse para purificar muestras que contienen hGH 20K.

20 Dado que se ha sugerido que la hGH 20K tiene un efecto terapéutico propio, se reivindica también una composición terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal en una sustancia vehículo aceptable farmacéuticamente, así como un método para tratar a un paciente que necesita reducir la cantidad de 20K administrándole la composición reivindicada.

Definiciones

25 Por fluidos o líquidos corporales se entiende, p. ej., suero, plasma, líquido linfático, sangre completa, orina, saliva, líquidos espinales, medio de cultivo de tejidos, extractos celulares.

30 hGH significa hormona humana del crecimiento (human Growth Hormone), hGH 20K significa la variante de la hGH con un peso molecular de 20 kDa, y hGH 22K significa la variante de la hGH con un peso molecular de 22 kDa.

35 mAb hGH-33 es el anticuerpo monoclonal (monoclonal Antibody) encontrado por los autores, que es un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la hormona humana del crecimiento (hGH) con peso molecular 20kDa, con escasa reacción cruzada con la hGH que tiene un peso molecular de 22 kDa, y que está cubierto por las reivindicaciones.

mAb hGH-12 es un anticuerpo monoclonal que es un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la hormona humana del crecimiento (hGH) con peso molecular 20kDa, y con hGH con peso molecular 22 kDa, igualmente bien con ambas.

40 mAb hGH-25 y mAb hGH-26 son anticuerpos monoclonales que son anticuerpos monoclonales capaces de unirse a la hormona humana del crecimiento (hGH) con peso molecular 22 kDa, sin reacción cruzada con la hGH de peso molecular 20 kDa.

45 Por el término anticuerpo (ab: anti-body) se entienden fragmentos de anticuerpo que se unen a un antígeno (Fv, Fab, Fab2, Fv de cadena simple, etc.), quimeras (tales como clase-clase y especie-especie), anticuerpos fusionados y anticuerpos recombinantes.

BSA	albúmina de suero bovino
cpm	cuentas por minuto
50 EIA	inmunoensayo ligado a una enzima
FCS	suero de ternera fetal
hGHR	receptor de la hormona humana del crecimiento
PBS	solución salina tamponada con fosfato
55 PEG	polietilenglicol

Parte experimental, materiales y métodos

Material

60 La GH 22K humana recombinante (rhGH-22K, Genotropin) y GH humana recombinante variante (rhGH-V) fueron obtenidas de Pharmacia Peptide Hormones (Suecia). La GH 20K humana purificada fue cedida gentilmente por el profesor Paul Roos (Uppsala, Suecia). Las hPL, hPRL y hGH-22K purificadas procedieron del profesor Dr. A. F. Parlow (Pituitary Hormones and Antiserum Center, Maryland, EE.UU.).

65 Inmunización

Ratones BALB/c, C57/BL10 y C3H/He fueron inmunizados subcutáneamente con 10-40 μ g de proteína en 0,1

ES 2 224 231 T3

ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril emulsionada con coadyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, EE.UU.). Los ratones fueron reinmunizados los días 30 y 60 con 20 μg de proteína en coadyuvante incompleto de Freund, e intraperitonealmente en PBS el día 90. Antes de la fusión celular, los ratones fueron reinmunizados por vía intravenosa los días -3 y -2 con 40 μg de hormona en PBS estéril.

5

El suero de los ratones inmunizados se recogió 7-10 días después de cada reinmunización y la presencia de anticuerpos específicos se determinó en inmunoensayos ligados a una enzima (EIA) o en radioinmunoensayos (RIA).

Fusiones celulares y producción de anticuerpos monoclonales

10

Células procedentes del bazo y/o ganglios linfáticos de ratones fueron fusionadas con la línea de células de mieloma P3X63Ag8.653 (CRL 1580, ATCC), usando polietilenglicol 4000 (Merck, Alemania) como agente de fusión y siguiendo protocolos estándar (15, 16).

15

Los sobrenadantes fueron ensayados en relación con la presencia de anticuerpos mediante EIA o RIA, y los hibridomas positivos se estabilizaron mediante dilución limitante usando una capa basal de alimentación (*feeder layer*) de timocitos, hasta que se consiguió una producción de anticuerpos estables. Los hibridomas se desarrollaron en RPMI-1640, 10% de FCS, en ausencia de antibióticos, a 37°C y 5% de CO_2 .

20

Los anticuerpos monoclonales fueron producidos tanto en sobrenadantes de cultivo de tejidos como en fluidos ascíticos inducidos en ratones inyectados con Pristane (Sigma Chemical Co) (17); se purificaron por precipitación con sulfato amónico (16) y/o cromatografía de afinidad en Sepharose proteína A inmovilizada (Pharmacia, Suecia).

25

El isotipo de cada mAb fue determinado en ensayos de difusión doble de Ouchterlony (18) usando antisueros específicos para clase y subclase (ICN).

Yodación y biotilación de proteínas

30

Las hormonas (2,5 μg en 20 ml de tampón de fosfato sódico 50 μM , pH 7,6) fueron yodadas usando tubos recubiertos con Iodogen (Pierce Chemical Co.) (19) o cloramina-T (20) como agentes oxidantes. Las hormonas yodadas se separaron del marcador no incorporado mediante filtración en gel en una columna G-25M Sephadex PD-10 (Pharmacia). La actividad específica de las hormonas marcadas osciló entre 10 y 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. La biotilación se realizó como ya se ha descrito (21). Las hormonas y el mAb (0,5 mg en 0,5 ml de NaCl 150 mM, tampón de carbonato 0,1M, pH 9) se incubaron con 50 μl de solución de 1 mg/ml de N-hidroxisuccinimida biotina en dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Co.) durante 120 minutos a temperatura ambiente. La biotina no acoplada se eliminó mediante diálisis frente a PBS. La proteína marcada con biotina se diluyó a la mitad con glicerol y se almacenó a una temperatura de -20°C.

35

Inmunoensayos ligados a una enzima

40

Se realizaron tres inmunoensayos ligados a una enzima (EIA) distintos (capturas de anticuerpo, de antígeno y tipo *sándwich*), que variaban en su mecanismo de presentación del antígeno al anticuerpo.

1. Inmunoensayos ligados a una enzima - captura de anticuerpo

45

Las hormonas (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) fueron adsorbidas en placas de microtítulo (Maxi-sorb, Nunc) durante la noche a 4°C. Los restantes sitios de unión de proteína fueron bloqueados con 0,5% de BSA en PBS. Después de lavar las placas con agua destilada, los mAb se incubaron durante 60 minutos a 37°C, seguido por un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa (GAM-PO) (Tago, Inc.) e hidrocloreto de o-fenilendiamina (OPD, 4 mg/ml en tampón de citrato sódico 0,15 M, pH 5,0, Sigma Chemical Co.). La reacción se terminó con ácido sulfúrico 3N y se determinó la densidad óptica a 492 nm.

50

2. Inmunoensayos ligados a una enzima - captura de antígeno

55

Los anticuerpos monoclonales fueron adsorbidos en la fase sólida, bien directamente (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) o por medio de un anticuerpo GAM purificado por afinidad. Después de bloquear, las hormonas marcadas con biotina diluidas 1/500 a 1/1000 en PBS que contiene 0,5% de BSA, fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C, seguido por estreptavidina marcada con peroxidasa (Sigma Chemical Co.), durante 30 minutos a 37°C y OPD. La reacción se terminó como antes.

3. Inmunoensayos ligados a una enzima - captura de tipo sándwich

60

Los mAb purificados (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) fueron adsorbidos sobre placas de microtítulo. Después de incubar durante la noche a 4°C y bloquear con 0,5% de BSA, se añadieron diluciones de la hormona en PBS-0,5% de BSA y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Después de lavar, se añadió un segundo mAb marcado con biotina (mAb hGH-12), previamente valorado para dar la unión óptima. El mAb hGH-12 se usó como segundo anticuerpo, ya que reconocía ambas formas moleculares. Después de eso, se añadieron estreptavidina marcada con peroxidasa y OPD. La reacción se terminó como antes.

65

ES 2 224 231 T3

Radioinmunoensayo - fase sólida

Los anticuerpos fueron adsorbidos sobre tiras de pocillos de RIA (Costar) mediante un anticuerpo GAM purificado por afinidad (2,5 µg/ml en PBS). Después de bloquear con 0,5% de BSA en PBS, se añadieron las hormonas marcadas con yodo (20.000 cpm/pocillo) y se incubaron durante 120 minutos a 37°C. Después de lavar con agua destilada, se contó la radiactividad unida.

Radioinmunoensayo - fase líquida

Los anticuerpos (100 µl/tubo), diluidos en fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, BSA al 0,25%, pH 7,6 (tampón para RIA) para dar la mitad de la unión máxima, se incubaron con 30.000 cpm de hormonas marcadas con yodo en 100 µl de tampón para RIA, en presencia o ausencia de hormonas no marcadas como competidores. Se añadió suero normal de ratón para dar 0,25% en un volumen de reacción final. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, la hormona unida y no unida de 400 µl se separaron incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente con 200 µl de antisuero GAM al 5% y 200 µl de PEG 6000 al 15% (Merck), seguido por centrifugación a 1520 x g durante 20 minutos. La radiactividad que queda en el sedimento se contó en un contador de radiación gamma.

Determinaciones de la constante de afinidad y reactividad cruzada

Las constantes de afinidad aparente (K_a) del mAb se calcularon por análisis de la representación de Scatchard de datos de RIA competitiva (22). Las reactividades cruzadas se definieron como la cantidad de competidor que se requiere para igual desplazamiento de trazador que se une al mAb.

Análisis sds-page y transferencias western

Las hormonas (15 µg de cada una) se sometieron a electroforesis en geles de 15% (p/v) de SDS-poliacrilamida de acuerdo con el método de Laemmli (23). Los geles fueron teñidos con azul Coomassie o transferidos a nitrocelulosa en un blotter semi-seco (Bio Rad) durante 60 minutos a 250 mA en un tampón de base Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol, que contiene 0,037% de SDS. Después de bloquear con 10% de leche desecada no grasa en PBS, los mAb fueron incubados con agitación durante 120 minutos a temperatura ambiente, seguido por un anticuerpo GAM-PO diluido 1/2500 (Tago Inc.). La mancha se desarrolló usando un sustrato de 4-cloro-1-naftol (Sigma Chemical Co.).

Ensayo de proliferación de células

Células Ba/F3 transfectadas con la construcción quimérica hGHR/G-CSFR se desarrollaron en medio RPMI-1640 suplementado con IL-3 (10 U/ml) y 10% de FCS a 37°C en 5% de CO₂. Las células (20 x 10⁵ células/ml) se lavaron en el mismo medio sin IL-3, y se añadieron 25 µl de la suspensión de células a placas de 96 pocillos. Las células se trataron con diversas concentraciones de hormonas (0,001 nM a 10 nM) en un volumen final de 100 µl durante 18 horas a 37°C. En los ensayos de competición, distintas concentraciones de mAb purificados (1 a 450 nM) y de hormonas (0,001 a 10 nM) fueron preincubadas durante 18 horas a 4°C antes del tratamiento de las células. Para medir la síntesis de ADN se añadió 1 µCi/pocillo de ³H-timidina (5 Ci/mmol). Después de 4 horas de incubación a 37°C en 5% de CO₂, las células se recolectaron y se lavaron en filtros de vidrio. La radiactividad se contó con un contador β.

Resultados

Ejemplo 1

Análisis de sueros en EIA de captura de anticuerpo

Cuando sueros procedentes de ratones inmunizados con hGH 20K ó 22K fueron analizados en un EIA de captura de anticuerpo, se encontró que todos los ratones respondían al correspondiente inmunógeno, con títulos (dilución de antisuero que da la mitad de la unión máxima) de 1/500 a 1/100.000, dependiendo del ensayo de cribado empleado y del inmunógeno usado.

Sueros procedentes de ratones inmunizados con hGH 20K fueron analizados en EIA de captura de anticuerpo usando hGH 20K y hGH 22K unidas a una fase sólida. Los títulos estaban en el intervalo de 1/500 a 1/10.000 para ambas hormonas, lo que demuestra la falta de especificidad para hGH 22 ó 20K.

Ejemplo 2

Radioinmunoensayo - fase sólida

Después de la fusión, los clones de hibridoma se cribaron mediante RIA en fase sólida usando ¹²⁵I-hGH 20K, y ocho híbridos mostraron actividad de unión (ocho veces o más que la de base). Solamente un anticuerpo no reconoció ¹²⁵I-hGH 22K en el RIA en fase sólida, y se seleccionó para su estabilización y para más caracterización (hGH-33). Los otros siete anticuerpos reconocen tanto hGH 20K como 22K.

ES 2 224 231 T3

Ejemplo 3

Radioinmunoensayo - fase líquida

5 Sueros procedentes de ratones inmunizados con hGH 22K fueron analizados en RIA en fase líquida frente a proteína 22K. Todos los sueros mostraron títulos elevados para el inmunógeno (>1/10.000) y los ratones fueron usados posteriormente para fusiones de células. Después de las fusiones, los híbridos productores de anticuerpos que se unen a ¹²⁵I-hGH 22K fueron seleccionados y estabilizados. Dos eran específicos para hGH-22K (mAb hGH-25 y mAb hGH-26), mientras que otro (mAb hGH-12) reconocía las dos formas moleculares igualmente bien.

10

Ejemplo 4

EIA de captura de antígeno y RIA competitiva en fase líquida

15 Los híbridos seleccionados del Ejemplo 2 fueron ensayados en EIA de captura de antígeno usando como competidores hormonas marcadas con biotina y sin marcar, o en un RIA en fase líquida competitivo. Las características de unión del mAb hGH-33 y como mAbs testigos los tres, hGH-25, hGH-26 y hGH-12, respectivamente, se resumen en la Tabla I.

20 Se utilizó RIA competitivo usando hormonas marcadas con yodo y mAb específico para la cuantificación de las hormonas. En la Figura 1 se muestra la inhibición de la unión mAb-¹²⁵I-hGH (20K o 22K) con rhGH-22K, hGH 20K, hGH-V, hPL y hPRL sin marcar.

25 Las Figuras 1A a 1C corresponden a mAb HGH-33 (A), hGH-12 (B) y hGH-25 (C). La GH unida es la radiactividad presente en el sedimento y se expresa como porcentaje del ¹²⁵I-hGH total aplicado.

30 El hGH-25 mAb fue empleado para hGH 22K, con un límite de detección para esta isoforma de 0,25 nM, mientras que las demás hormonas ensayadas (hGH 20K, hGH-V, hPL y hPRL) no compitieron, ni siquiera a concentraciones 1000 veces más altas (Fig. 1C). El hGH-33 mAb fue usado para hGH 20K, con un límite de detección de 0,5 nM, aunque se observó una competición despreciable para el resto de las hormonas ensayadas (Fig. 1A).

Los datos de RIA competitivo usando ¹²⁵I-hGH 20K indicaron que (mAb) HGH-33 tiene una K_a aparente para hGH 20K de 2,2 x 10⁹ M⁻¹ y menos del 1% de reactividad cruzada con hGH 22K, hGH-V, hPL y hPRL (Fig. 1A).

35 El mAb hGH-12 reconoce hGH-V, hGH 20K, hGH 22K igualmente bien, tiene 40% de reactividad cruzada para hPL y <1% con hPRL (Fig. 1B). Los otros dos mAb (hGH-25 y hGH-26) son específicos para hGH 22K, lo que indica una reactividad cruzada despreciable con las hormonas relacionadas y con una K_a aparente de 10⁸-10¹⁰M⁻¹ (Fig. 1C).

TABLA I

Características principales de los anticuerpos monoclonales

40

Anticuerpo monoclonal	K _a x 10 ⁹ (M ⁻¹) ¹	REACTIVIDAD CRUZADA (%) ²				
		22K	20K	hGH-V	hPRL	hPL
hGH-25	7,5	100	<1	<1	2	<1
hGH-26	3,5	100	<1	<1	5	<1
hGH-33	2,2	<1	100	<1	<1	<1
hGH-12	3	100	80	100	<1	40

45

50

55

¹ Las constantes de afinidad aparentes se calcularon a partir de RIA competitivo con hGH 22K (hGH-25, 26 y 12) o hGH 20K (hGH-33) usando el análisis de la representación de Scatchard).

² Las reactividades cruzadas se expresan con la inversa del porcentaje de la cantidad de hormona no marcadas requerida para un 50% de desplazamiento de hormona marcada del mAb.

60

Ejemplo 5

EIA de captura de anticuerpo

65 En el EIA de captura de anticuerpo, las características de unión de mAb varían. El mAb hGH-33 no reconoce hormonas adsorbidas en una fase sólida, aunque no es este el caso para los mAbs hGH-12, hGH-25 y hGH-26 (datos no mostrados).

ES 2 224 231 T3

Ejemplo 6

Ensayo tipo sándwich

- 5 Para ensayar la factibilidad del uso de este mAb para la detección específica de la diversas formas moleculares de hGH, se han desarrollado dos ensayos *sándwich* distintos. En cada uno de ellos se usa un mAb específico para la isoforma como anticuerpo de captura, hGH-33 en el caso de hGH 20K y hGH-26 para hGH 22K. En ambos ensayos se uso mAb hGH-12 marcado con biotina como segundo anticuerpo, ya que reconoce ambas formas moleculares.
- 10 La sensibilidad de cada ensayo específico es 0,2 nM para hGH 22K y 0,2 nM para hGH 20K, y no se observó reacción cruzada con otras hormonas relacionadas (Fig. 2A y 2B).

Ejemplo 7

15 *Transferencia Western*

- Los anticuerpos hGH-25 y hGH-26 reconocieron específicamente la correspondiente hormona purificada en la transferencia Western bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. El mAb hGH-33 no reconoce hGH 20 K en la transferencia Western, como es de esperar de sus características de unión en el EIA de captura de anticuerpo.

20

Ejemplo 8

Proliferación de células

- 25 Los anticuerpos específicos para las isoformas hGH fueron caracterizados funcionalmente ensayando su capacidad para bloquear el crecimiento de células dependiente de la hGH. Estimulación del crecimiento de células Ba/F3 quiméricas transfectadas con hGHR/G-CSF en respuesta a hGH 22K y hGH 20K. Las células fueron tratadas con concentraciones de hormona crecientes durante 18 horas. La síntesis de ADN se midió mediante la incorporación de ³H-timidina.

30

- Las células Ba/F3 de tipo silvestre requieren IL-3 exógena para crecer en cultivos *in vitro* (24). Las células Ba/F3 fueron transfectadas con un gen quimérico que contiene el dominio extracitoplásmico del receptor de hGH, y los dominios transmembrana e intracitoplásmico del receptor de G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos). Mientras ambas células, de tipo silvestre y transfectadas, crecen en presencia de IL-3 exógena, solamente las células transfectadas proliferan en presencia de GH humana. Como se muestra en la Fig. 3, tanto hGH 20K como 22K favorecen igual proliferación en las células transfectadas. En ambos casos, el intervalo de concentración de hormona con efecto máximo era 2 a 10 nM.

35

- Bloqueo del anticuerpo monoclonal de la actividad de hGH 22K y 20K sobre células transfectadas Ba/F3: Se preincubaron hormonas (1 nM) con hGH-33 74 nM y hGH-12, 25 y 26 222 nM durante 18 horas a 4°C antes de ser añadidas al cultivo. Los datos de la Figura 4 representan la media de determinaciones por triplicado, con indicación de la desviación estándar.

40

- La proliferación inducida por hGH 22K fue inhibida específicamente por el mAb hGH-25 y hGH-26, pero no por hGH-33, mientras que la proliferación inducida por hGH 20K fue inhibida solamente por hGH-33 (Fig. 4). El mAb hGH-12, que reconoce ambas hormonas igualmente bien en fase líquida, muestra un efecto inhibidor parcial de hGH 22K y 20K, aunque este anticuerpo se une, y lo inmunoprecipita, al complejo hGH (22 y 20K)-GHBP/GHR con afinidad elevada.

45

50 Ejemplo 9

Detección y cuantificación de hGH 20K en muestras de suero

- Como ejemplo de fluido corporal se usó suero humano normal para investigar el ensayo de tipo *sándwich* en relación con la especificidad y la posibilidad de uso para la cuantificación del 20K.

55

- En el ensayo, el anticuerpo específico para 20K, hGH-33, se usó como anticuerpo de captura, y como anticuerpo de detección se usó el hGH-12 marcado con biotina. Para la medida de las señales se usó fluorometría de resolución de tiempo (TRF).

60

- Se usó una agrupación de suero normal para el ensayo de dosis-respuesta de hGH 20K y hGH 22K. Concentraciones crecientes, de 0,5 a 50 ng/ml, de 20K hGH tuvieron por resultado señales de respuesta crecientes. La adición de 50 ng/ml de 22K hGH no pudo ser detectada en el ensayo. El aumento de la concentración de 22K hGH a 500 ng/ml tuvo por resultado una señal débil y se calculó que la reactividad cruzada era menor que 0,5% en el ensayo *sándwich* de 20K (Fig. 5). El nivel de sensibilidad está por debajo de 0,5 ng/ml.

65

- En la Fig. 5 se muestra la relación dosis-respuesta de 20K- y 22K hGH añadida a una agrupación de suero humano normal.

ES 2 224 231 T3

El anticuerpo de captura es hGH-33 y el anticuerpo de detección es hGH-12 (biotinilado).

Como sistema de ensayo se usó el inmunoensayo de fluorescencia de resolución en el tiempo, TR-FIA.

5 Esto indica claramente que el anticuerpo específico trabaja perfectamente en suero humano normal, y que por tanto puede ser usado para detección y cuantificación por inmunoensayo.

Discusión

10 La hormona del crecimiento está presente en fluidos biológicos como mezcla de varias isoformas de hGH, en varios estados de agregación o en complejos. El efecto neto de esta mezcla extraordinariamente compleja sobre la unión con el receptor y la actividad biológica es difícil de evaluar con precisión. Es probable que muchas de las formas de hGH compitan por la unión del receptor, actúen como agonistas y/o antagonistas parciales y produzcan modulación cruzada de la bioactividad de las otras isoformas (25). Esta heterogeneidad, junto con las diferencias entre anticuerpos
15 (tanto policlonales como monoclonales) usados en los ensayos, pueden justificar las discrepancias observadas en las determinaciones de hGH (26).

Los inmunoensayos se basan en la existencia de anticuerpos específicos para el epítipo. El uso de anticuerpos monoclonales supuso un aumento tanto de la especificidad como de la sensibilidad, así como en la manejabilidad de
20 estos ensayos. Los autores han producido y caracterizado mAb para ser usados como eficaces herramientas para medir con precisión la concentración de una isoforma de hGH, y para comprender la correspondiente biología.

Se han desarrollado EIA de tipo *sándwich* y RIA competitivo para detectar cada una de estas variantes específicamente en sistemas tampón, con sensibilidades comparables a las previamente descritas (12).

25 La hormona hGH 20K tiene la misma secuencia de aminoácidos que hGH 22K, excepto por un borrado interno de 15 restos de aminoácidos (E32 a Q46). Distintas actividades han sido reivindicadas para hGH 20K en comparación con hGH 22K (25), tal como la disminución de la promoción de la actividad tipo insulina, más potencia lactogénica que somatogénica (11), y una afinidad disminuida por los receptores de hGH así como por la proteína de unión relacionada
30 con el receptor (8, 25). Además, se ha descrito una proteína de unión de hGH 20K específica, no relacionada con el receptor (27, 28, 29). No obstante, la mayoría de estos datos están lejos de ser concluyentes.

Anticuerpos monoclonales anti-hGH han sido establecidos por varios grupos (30, 31, 32) y también se han producido mAb con respuestas mejoradas contra hGH 22K en comparación con hGH 20K (33). En la presente invención, los
35 autores han establecido dos hibridomas que segregan mAb específicos para hGH 22K, uno para hGH 20 K y uno que reconoce ambas isoformas igualmente bien. En todos los casos, el mAb generado tiene alta afinidad (de 10^8 M^{-1} a 10^{10} M^{-1}) y una reactividad cruzada despreciable con otras hormonas relacionadas, incluyendo hGH-V, hPRL y hPL. El anticuerpo específico anti-hGH 20K se generó usando la proteína nativa como inmunógeno. Probablemente reconoce un epítipo conformacional presente solamete en la forma hGH más corta, y este mAb no reconoce péptidos que contienen el nuevo enlace peptídico E32-Q46 (datos no mostrados) y no reconoce hGH 20K bajo condiciones que podrían
40 alterar su estructura (transferencia Western, adsorción en una fase sólida). En cambio, los dos mAb específicos para hGH 22K reconocen la proteína bajo condiciones de desnaturalización. Como la única diferencia entre 22K y 20K es el borrado o delección de 15 aminoácidos, hGH-25 y hGH-26 han de reconocer una secuencia dentro de este tramo de
45 15 aminoácidos.

Dado que la actividad biológica de hGH 20K y 22K no ha sido aún claramente diferenciada, los autores ensayaron el efecto de estos mAb en un ensayo de actividad de GH, usando células Ba/F3 que expresan el receptor quimérico hGHR/G-CSFR y seleccionaron en relación con el crecimiento con hGH 22K. Estas células proliferan
50 igualmente bien en presencia tanto de 22K como de 20K. El mAb hGH-33 bloquea específicamente el efecto de hGH 20K, mientras que hGH-25 y 26 bloquean específicamente el de 22K. Las secuencias descritas como participantes en la unión del receptor hGH 22K (34) están también presentes en hGH 20K. Suponiendo que regiones similares en ambas hormonas están implicadas en la unión al receptor, el bloqueo específico de la isoforma de la actividad biológica usando mAb no debería ser posible a menos que estas regiones presenten diferencias conformacionales. Esto permitiría el reconocimiento específico por el mAb y podría explicar las diferencias de afinidad por el receptor de hGH entre estas dos hormonas (8, 25). Más estudios sobre los epítopos precisos reconocidos por estos mAb, serían interesantes para la definición de las estructuras hormonales implicadas en la unión del receptor.
55

En resumen, estos mAb podrían ser usados para cuantificar hGH 22K y 20K en muestras biológicas, y debido a su comportamiento como antagonistas específicos, pueden ser empleados en la determinación de los papeles fisiológicos de estas isoformas.
60

Así pues, los autores han derivado y caracterizado un conjunto de anticuerpos monoclonales (mAb) específicos para las distintas isoformas de la hormona del crecimiento humana (hGH). Estos anticuerpos se denominan hGH-25, hGH-26, hGH-33 y hGH-12, respectivamente. Las características de unión de cada anticuerpo a las isoformas de hGH (22K y 20K) fueron analizadas en inmunoensayos de anticuerpos *sándwich*, directos y competitivos, así como en transferencia Western. El hGH-33 es el anticuerpo que es específico contra hGH 20K.
65

ES 2 224 231 T3

Una línea de células de hibridoma que expresan el anticuerpo según las reivindicaciones, mAb hGH-33, ha sido depositada bajo el número DSM ACC 2254 el 28 de febrero de 1996.

Referencias

- 5
- (1) **Li CH** 1975 The chemistry of pituitary growth hormone: 1967-1973. In; Li CH (ed) Hormonal proteins and peptides. *Academic press*. New York. vol. 3:1-40.
- (2) **Lewis UD, Singh RNP, Tutwiler GF, Sigel MB, Vanderlaan EF, Vanderlaan WP** 1980 Human growth hormone- a complex of proteins. *Rec Prog Horm Res* 36:477-504
- 10
- (3) **Baumann G** 1990 Growth hormone binding proteins and various forms of growth hormone: implications for measurements. *Acta Paediatr Scand* (Suppl) 370:72-80
- (4) **Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelines RF, Seeburg PH** 1989 The growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics* 4:479-497
- 15
- (5) **Barsh GS, Seeburg PH, Gelinas RE** 1983 The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nuc Acid Res* 11:3939-3058
- 20
- (6) **Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK, Vanderlaan WP** 1978 A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J Biol Chem* 253:2679-2687
- (7) **Lewis UJ, Bonewald LF, Lewis LJ** 1980 The 20,000-dalton variant of human growth hormone: location of the amino-acid deletions. *Biochem Biophys Res Commun* 92:511-516
- 25
- (8) **Mc Carter J, Shaw MA, Winer LA, Baumann G** 1990 The 20,000 Da variant of human growth hormone does not bind to growth hormone receptors in human liver. *Mol Cell Endocrinol* 73:11-14
- (9) **Wohnlich L, Moore WV** 1982 Binding of a variant of human growth hormone to liver plasma membranes. *Horm Metab Res* 14:138-141
- 30
- (10) **Frigeri LG, Peterson SM, Lewis UJ** 1979, The 20,000-dalton structural variant of human growth hormone: Lack of some early insulin-like effects. *Biochem Biophys Res Commun* 91:778-782
- 35
- (11) **Lewis UJ** 1992 Growth hormone. What is it and what does it do?. *Trends Endocrin. Metabol.* 3:117-121
- (12) **Chatelain P, Bouillat B, Cohen R, Sassolas G, Souberbielle JC, Ruitton A, Joly MO, Job JCl** 1990 Assay of growth hormone levels in human plasma using commercial kits: analysis of some factors influencing the results. *Acta Paediatr Scand* (Suppl) 370: 56-61
- 40
- (13) **Woodhead S, Turner G** 1991 Accuracy of growth hormone measurements. *Horm Res* 36 (suppl):17-20
- (14) **Lewis UJ, Sinha YN, Haro LS** 1994 Variant forms of human growth hormone in serum. *Acta Paediatr* (suppl) 399:29-31
- 45
- (15) **Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC** 1977 Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266: 550-552
- (16) **Harlow E, Lane D.** 1988 Antibodies, a laboratory manual. In: Harlow I and Lane D (eds). *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York.
- 50
- (17) **Hoogenraad NJ, Wraight CJ.** 1986 The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. *Methods Enzymol* 121:375-381
- 55
- (18) **Ouchterlony Ö.** 1949 Antigen-antibody reactions in gels. *Ark Kemi Mineral Geol* 26:1, last page.
- (19) **Fraker PJ, Speck JC** 1978 Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80:849-857
- 60
- (20) **Hunter WM, Greenwood FC** 1962 Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496
- (21) **Goding JW** 1987 Monoclonal antibodies: principles and practice. 2nd ed. *Academic Press*. London
- 65
- (22) **Scatchard G** 1949 The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-772

ES 2 224 231 T3

(23) **Laemmli EK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 277:680-685

5 (24) **Palacios R, Steinmetz M** 1985 IL-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B-lymphocytes *in vivo*. *Cell* 41:727-734

(25) **Baumann G** 1991 Metabolism of growth hormone (GH) and different molecular forms of GH in biological fluids. *Hor. Res.* 36:5-10.

10 (26) **Granada M, SanMartí A, Lucas A, Salinas I, Carrascosa A, Foz M, Audí L** 1990. Assay-dependent results of immunoassayable spontaneous 24-hour growth hormone secretion in short children. *Acta Paediatr. Scand.* 370:63-70.

15 (27) **Baumann G and Shaw MA** 1990 Plasma transport of the 20,000-dalton variant of human growth hormone (20K): evidence for a 20K-specific binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1339-1343

(28) **Baumann G, Amburn K and Shaw MA** 1988 The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinol* 122:976-984

20 (29) **Baumann G and Shaw M** 1990 A second, lower affinity growth hormone-binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 70:680-686

(30) **Wallis M and Daniels M** 1983 Binding specificity of monoclonal antibodies towards fragments of human growth hormone produced by plasmin digestion. *FEBS Letters* 159:241-245

25 (31) **Basuyaux B, Paolucci F, Clavies C, Hervaud E, Pau B and Peyrouset A** 1987 Production and characterization of monoclonal antibodies to human growth hormone. *Hybridoma* 6:423-431

30 (32) **Ivanyi J** 1982 Study of antigenic structure and inhibition of activity of human growth hormone and chorionic somatomammotropin by monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 19:1611-1618

(33) **Nakanishi T, Matsui H and Noguchi H** 1989 Monoclonal antibodies which preferentially bind to 22K human growth hormone rather than its 20K variant. *Endocrinol Japon* 36:481-490

35 (34) **Cunningham BC, Jhurani P, Ng P, Wells JA** 1989 Receptor and antibody epitopes in human growth hormone identified by homolog-scanning mutagenesis. *Science* 243:1330-1336

40

45

50

55

60

65

ES 2 224 231 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal específico para la hormona humana del crecimiento (hGH) con un peso molecular de 20 kDa (hGH 20K), teniendo el anticuerpo monoclonal una afinidad para hGH 20K de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ o mayor, y teniendo una reactividad cruzada inferior al 5% con la hGH que tiene un peso molecular 22 kDa (hGH 22K), en el que el anticuerpo monoclonal reconoce el epítipo conformacional reconocido por mAb-33 producido por la línea de células de hibridoma depositada como DSM ACC 2254.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1ª, que tiene una afinidad para hGH 20K de al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, y más preferentemente más de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.
3. El uso del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª para la medida *in vitro* de hGH 20K.
- 15 4. El uso según la reivindicación 3ª para la medida *in vitro* en fluidos corporales.
5. El uso según la reivindicación 4ª para la medida en suero.
- 20 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4ª y 5ª en un ensayo multianalítico.
7. El uso del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª para la purificación de preparados que contienen hGH 20K.
- 25 8. Método para la detección y cuantificación por inmunoensayo de hGH 20 K, que comprende las etapas de:
- 1) poner en contacto una muestra que contiene hGH 20K con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1ª o 2ª, para formar un complejo entre el anticuerpo y la hGH 20K en una cantidad que está relacionada con la cantidad de hGH 20K en la muestra, y
- 30 2) determinar la cantidad de complejo formado de una manera ya conocida y relacionar la cantidad encontrada con la cantidad de hGH 20 K en la muestra.
9. Una composición terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1ª o 2ª en una sustancia vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 35 10. Una línea de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1ª.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

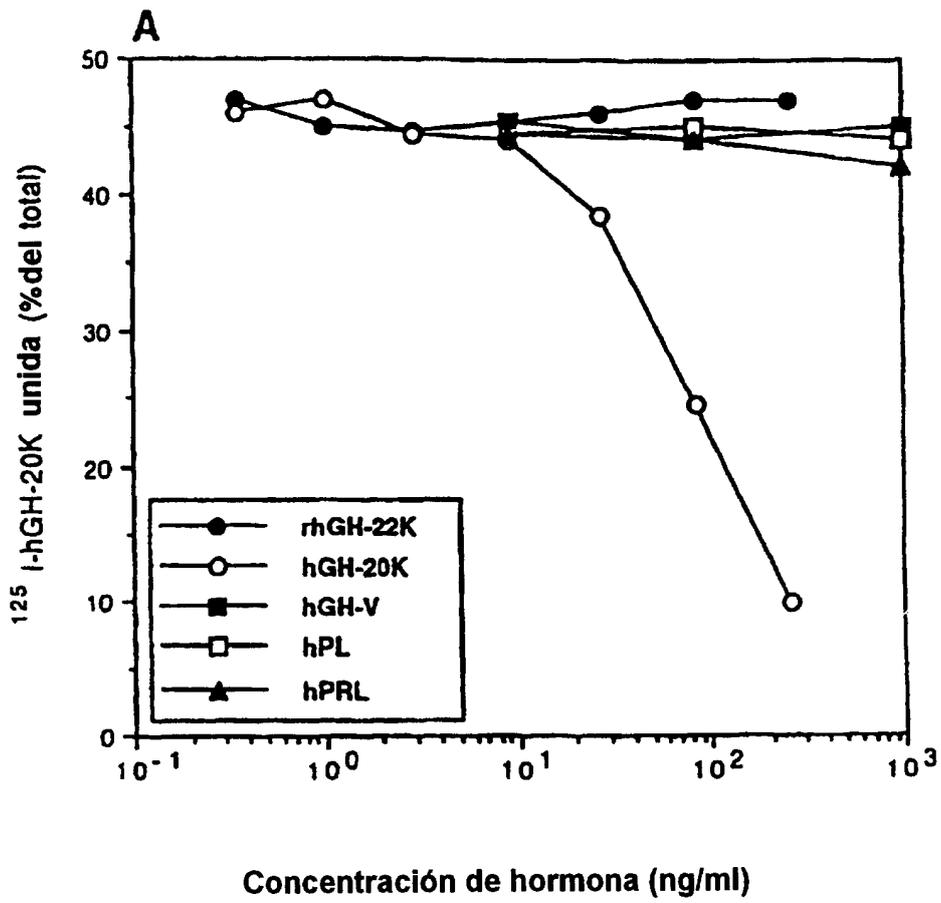


Figura 1A

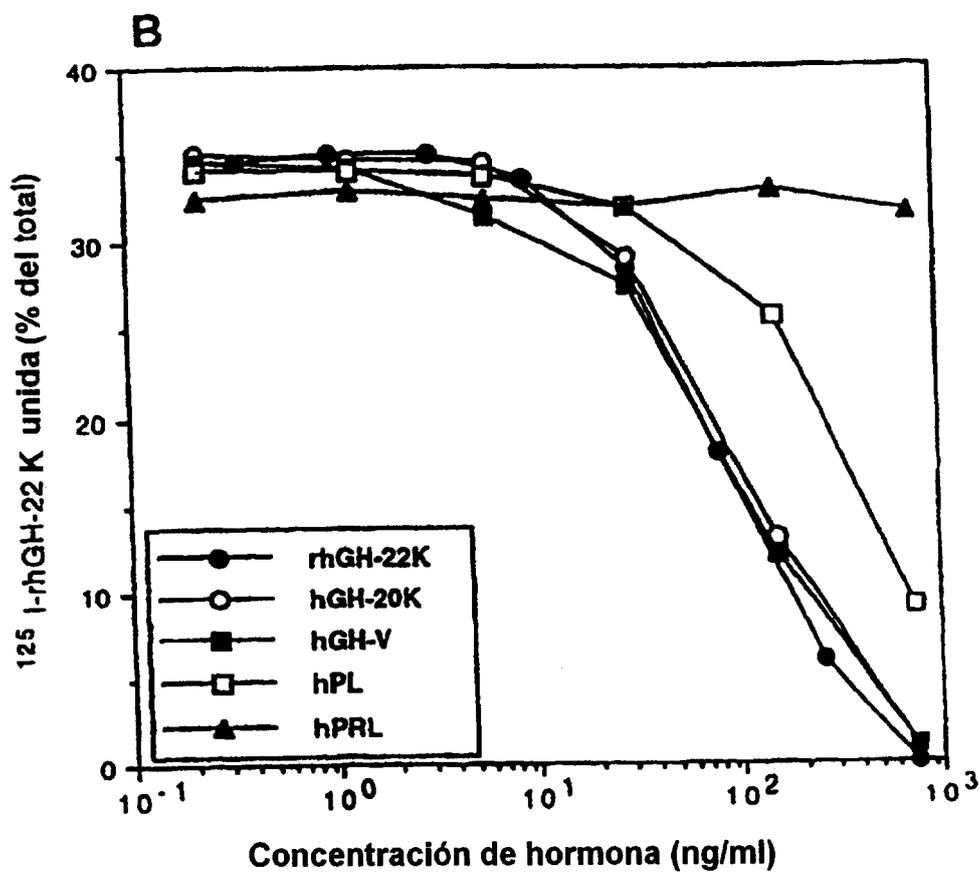


Figura 1B

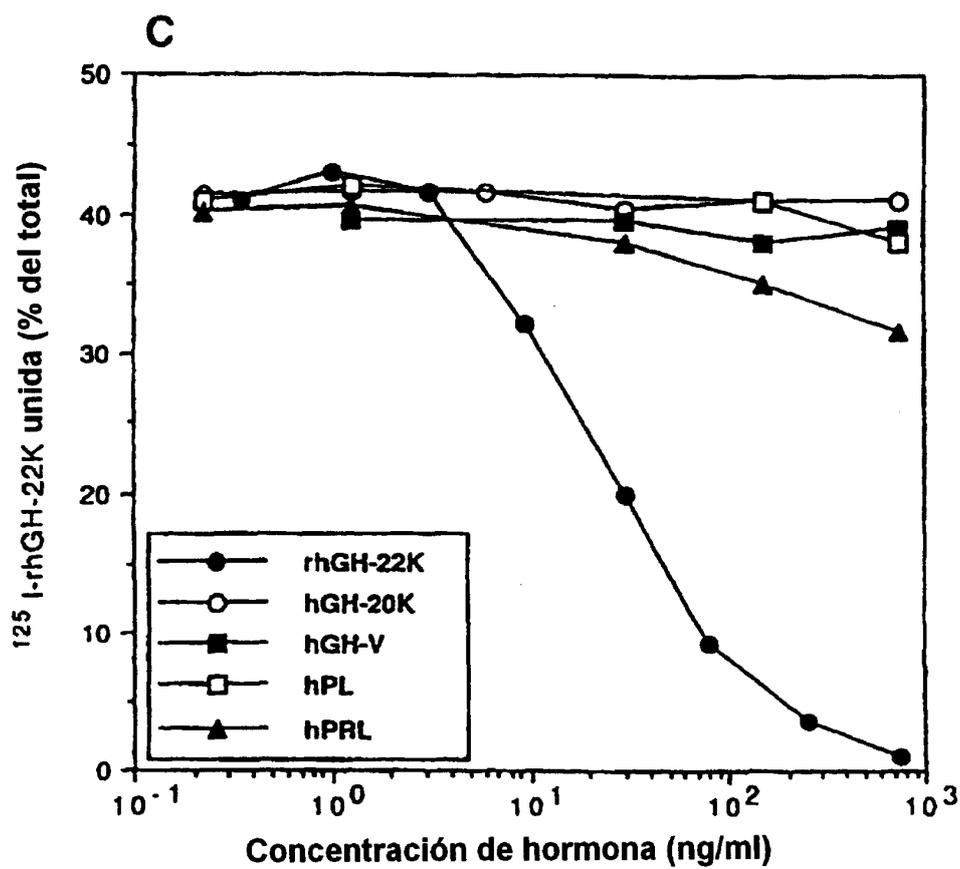


Figura 1C

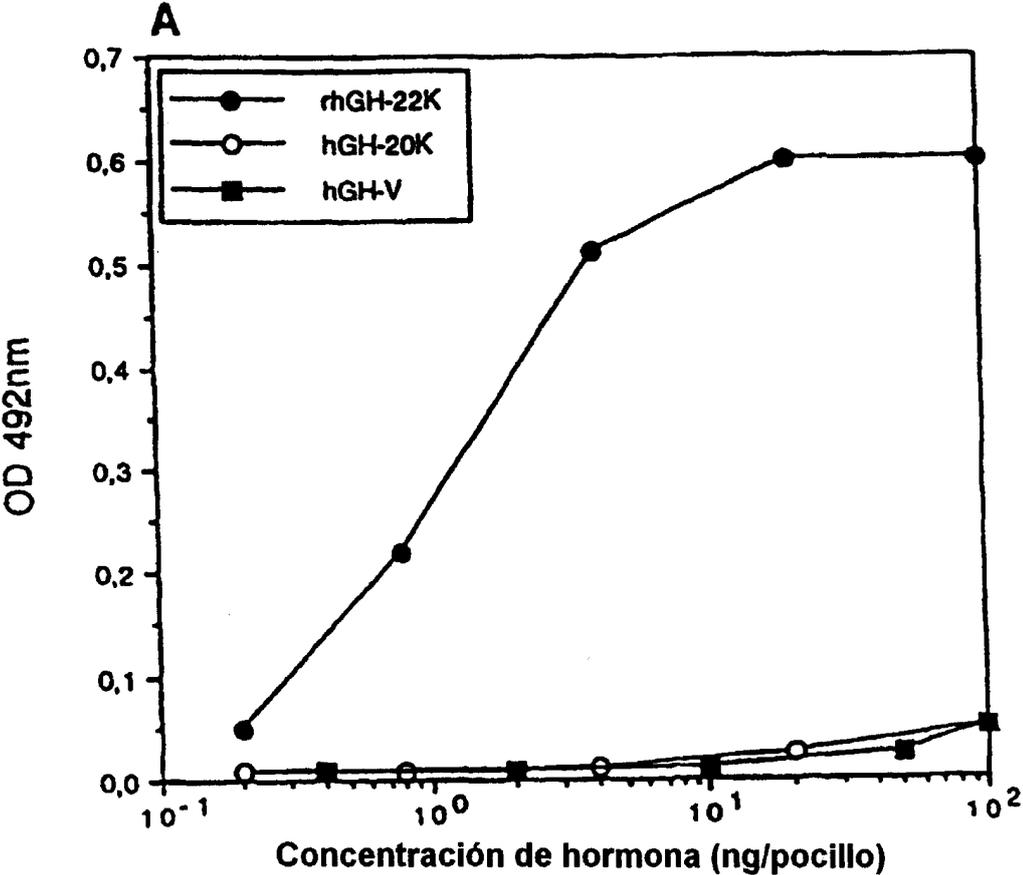


Figura 2A

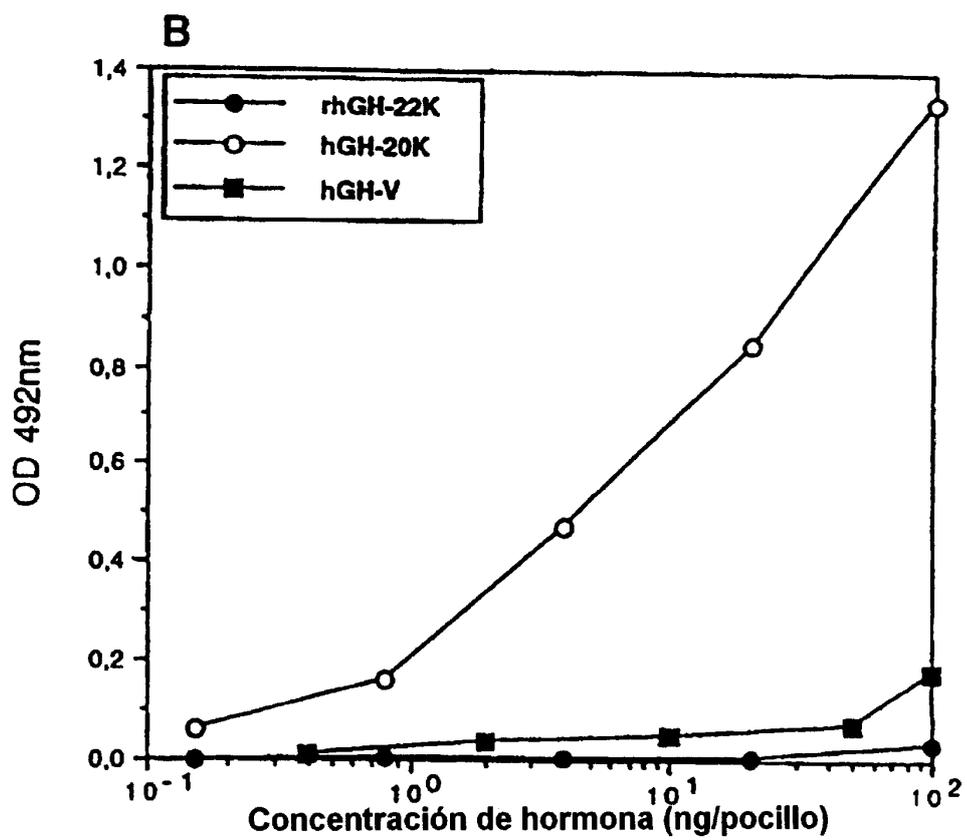


Figura 2B

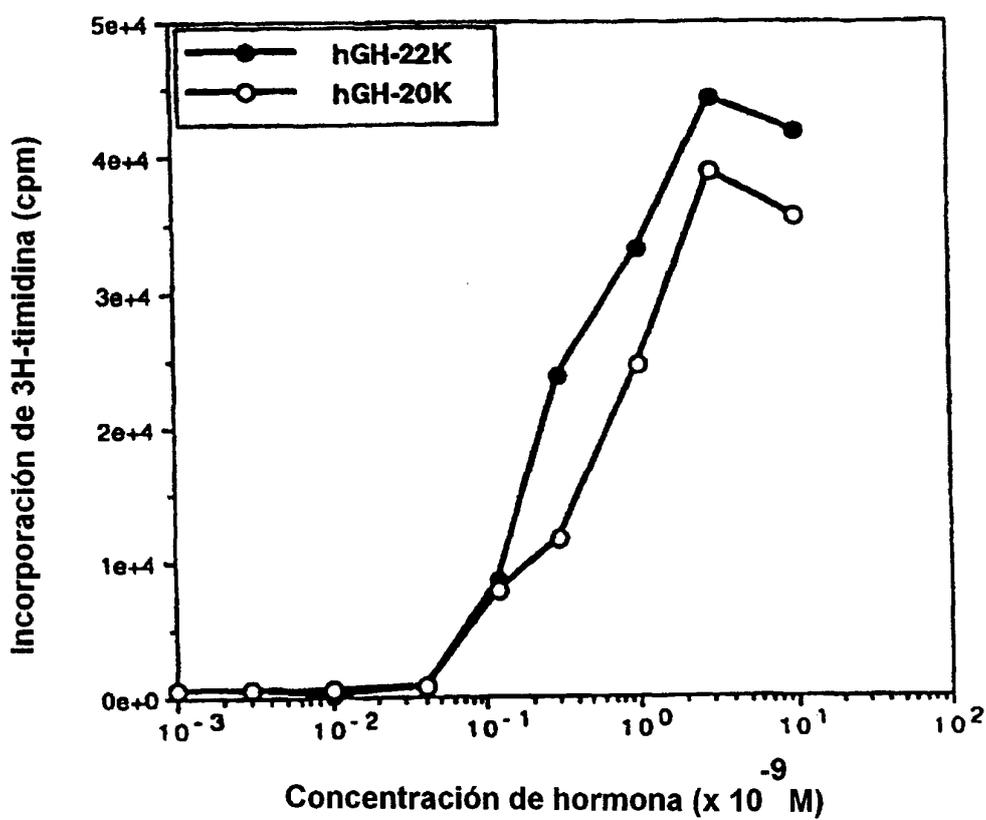


Figura 3

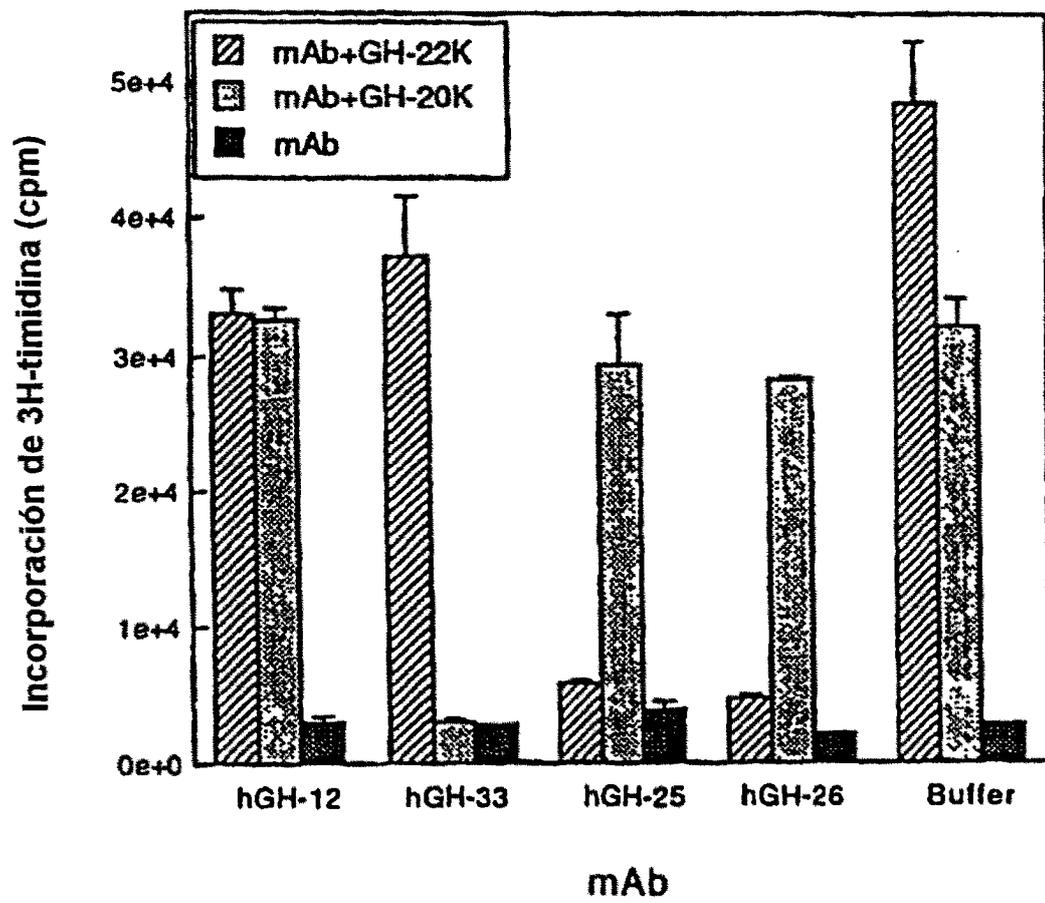


Figura 4

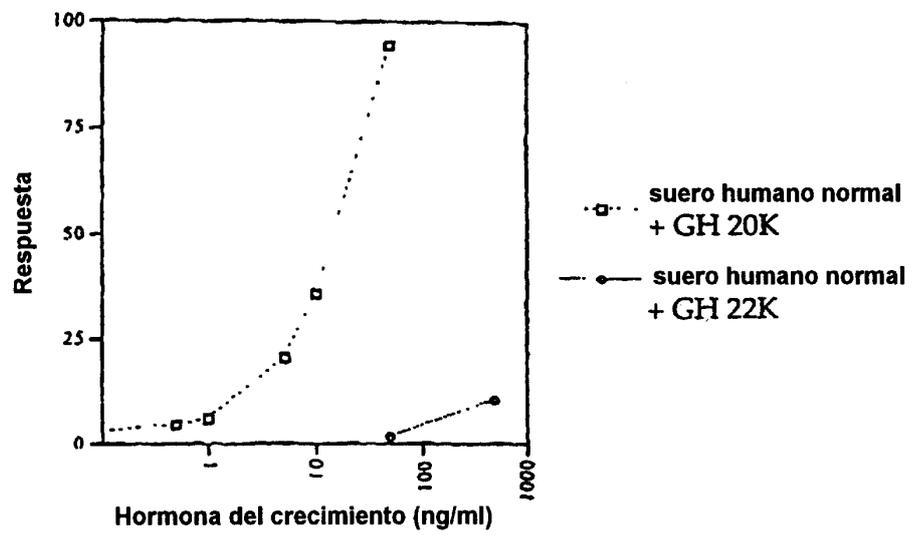


Figura 5