

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 175**

51 Int. Cl.:

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/534 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2017** **PCT/CN2017/071969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2018** **WO18133039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2017** **E 17868496 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3376226**

54 Título: **Método y kit para preparar un par de anticuerpos y uso del kit, y sistema para preparar un par de anticuerpos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2020

73 Titular/es:

**SHENZHEN NEW INDUSTRIES BIOMEDICAL
ENGINEERING CO., LTD. (100.0%)
No. 16, Jinhui Road, Jinsha Community, Kengzi
Street, Pingshan New District,
Shenzhen, Guangdong 518122, CN**

72 Inventor/es:

**RAO, WEI y
ZHANG, YU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 799 175 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

Método y kit para preparar un par de anticuerpos y uso del kit, y sistema para preparar un par de anticuerpos

Campo técnico

- 5 La presente solicitud se refiere al campo técnico de Biomedicina, específicamente se refiere a un método para preparar un par de anticuerpos y al uso de un kit en la preparación del par de anticuerpos.

Antecedentes

- 10 El método sándwich de doble anticuerpo es una técnica para la detección cuantitativa de un antígeno mediante el uso de dos anticuerpos que se unen al mismo antígeno y se utiliza ampliamente en ELISA, CLIA, RIA y otros análisis de detección inmunológica debido a sus ventajas de alta sensibilidad, fuerte capacidad contra interferencias y otras similares.

- 15 En el proceso de aplicación del método sándwich de doble anticuerpo, por un lado, la formación del impedimento estérico luego de la unión del anticuerpo a un antígeno evitará que la mayoría de los demás anticuerpos se puedan unir nuevamente al antígeno, y los anticuerpos que se pueden emparejar exitosamente entre sí tienen requisitos excluyentes en cuanto al ángulo de unión del anticuerpo y la distancia entre los determinantes del antígeno identificados; por otro lado, cada sistema de detección tiene requisitos diferentes en los pares de anticuerpos ya que las fases sólidas y los marcados adoptados son diferentes, por ejemplo, no todos los pares de anticuerpos que pueden ser usados en ELISA pueden ser usados en CLIA, lo que plantea más requisitos en los pares de anticuerpos.

- 20 Anticuerpos emparejados o un par de anticuerpos se refiere a dos anticuerpos idénticos o diferentes capaces de unirse a un antígeno simultáneamente. En la actualidad, el método general para preparar anticuerpos emparejados es el siguiente: 1) preparar un lote de anticuerpos monoclonales contra el antígeno objetivo mediante la técnica de hibridoma, ADLib o biblioteca de anticuerpos en fagos y otros métodos; 2) obtener los anticuerpos anteriormente mencionados en grandes cantidades mediante ascitis o cultivo celular a gran escala y otros enfoques; 3) combinar todos los anticuerpos en pares (también sus propias combinaciones), uno usado como anticuerpo de captura inmovilizado en la placa ELISA, microesferas magnéticas y otros medios en fase sólida, y otro usado como anticuerpo marcado con compuestos cromogénicos (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano o luminol y otras sustancias); 4) detectar el antígeno objetivo mediante el método sándwich, determinar si el emparejamiento es exitoso según la fuerza de la señal.

- 30 Este método, también conocido como el método escopeta (shotgun) en el sentido convencional, tiene muchos factores limitantes. En primer lugar, debido a las limitaciones de mano de obra el número de anticuerpos adquiridos a través del paso 1) suele ser de sólo unas pocas docenas, lo que limita en gran medida el rango de opciones; en segundo lugar, los anticuerpos de alta sensibilidad obtenidos a partir del paso 1) tienen una mayor posibilidad de no encontrar un anticuerpo con el que emparejar, y por lo tanto se descartan. En tercer lugar, la preparación, purificación, y marcado a gran escala de anticuerpos en el proceso de emparejamiento consumen mucho tiempo y son trabajosos; y el proceso de marcado puede influir en los propios anticuerpos, interfiriendo así en el juicio.

- 40 Existen pocas mejoras existentes en el método de preparación de anticuerpos emparejados. Se puede hacer referencia a la patente china CN 103884842 A. Las mejoras incluyen: 1) marcar los anticuerpos a cribar con biotina y compuestos cromogénicos respectivamente, y luego recubrir la avidina y realizar la detección de emparejamiento usando el método ELISA sándwich; 2) eliminar la interferencia de la dosificación del anticuerpo para la detección mediante el método de normalización (es decir, dividir la señal de detección por la concentración del par de moléculas de anticuerpo usado); 3) el cribado se realiza según el principio de que la señal de detección del par de anticuerpos compuesto por la misma molécula de anticuerpo no es más fuerte que la señal de detección del par de anticuerpos compuesto por una molécula de anticuerpo y otra molécula de anticuerpo. Además, como se describe en la patente europea WO 2004025248 A2, los anticuerpos emparejados se criban por la comparación de que la afinidad del complejo es mayor que la reactividad cruzada de los anticuerpos. Todos los métodos anteriores requieren preparar los anticuerpos por adelantado, y el efecto se basa únicamente en la mejora de la precisión del emparejamiento.

- 55 La presente invención se refiere a un método para preparar un par de anticuerpos, la técnica anterior más próxima se conoce a partir de G WANG ET AL: "Persistent expression of biologically active anti-HER2 antibody by AAVrh.10-mediated gene transfer", CANCER GENETHERAPY, vol.17,no.8,7 mayo 2010 (2010-05-07), páginas 559-570, XP055407360 GB ISSN:0929-1903, DOI:10.1038/cgt.2010.11. Las tecnologías pertinentes también se conocen a partir de KYNER J L ET AL: "Immunoregulation of anti-islet cell antibody in insulin-dependent diabetes: Failure to detect anti-idiotypic antibody following seroconversion", CLINICAL

IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 53, no. 2, 1 noviembre 1989 (1989-11-011, páginas 321-328,XP022958174, ISSN:0090-1229, DOI:10.1016/0090-1229(89)90060-3, WO 2013/177062 A2 y WO 2007/011746 A2.

Resumen

- 5 La presente solicitud tiene como objetivo proporcionar un método para preparar un par de anticuerpos y el uso de un kit en la preparación de un par de anticuerpos, para resolver los problemas técnicos en la técnica anterior, en que la preparación de anticuerpos requiere muchos procesos como preparación, purificación, marcado y otros, y la carga de trabajo es demasiado grande.
- 10 Para lograr los objetivos anteriores, según un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar un par de anticuerpos. El método comprende usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado para cribar directamente un anticuerpo objetivo que pueda emparejarse con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular; el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo es Fab' o F(ab)₂, preferiblemente F(ab)₂; y el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc.
- 15 Además, el método también comprende: optimizar los anticuerpos cribados según un contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular o la fuerza de unión de un anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular a un antígeno objetivo, y dicho sobrenadante de cultivo celular proviene de células de hibridoma.
- 20 Además, el anticuerpo marcado se marca mediante un marcador rastreador que marca directa o indirectamente el anticuerpo marcado; preferiblemente, el marcador rastreador se selecciona de al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados y un marcado radiactivo.
- 25 Además, el paso de optimización comprende: a) detectar los anticuerpos cribados que puedan ser emparejados con el anticuerpo de captura en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método sándwich, y registrar la señal resultante como OD₁; b) detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular y registrar la señal resultante como OD₂; c) detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo, y registrar la señal resultante como OD₃; d) evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en el paso a) basado en la proporción OD₁/OD₂ o OD₁/OD₃.
- 30 Además, el paso d) comprende: 1) si el cultivo celular es un cultivo celular de cepa celular individual, entonces el anticuerpo con mayor OD₁/OD₂ se empareja mejor con el anticuerpo existente; 2) si el cultivo celular es un cultivo celular de múltiples cepas celulares, entonces el cultivo celular con mayor OD₁/OD₃ se selecciona para separarse en células individuales para el cultivo continuo a fin de obtener nuevos cultivos celulares, y los nuevos cultivos celulares se optimizan adicionalmente enseguida al paso 1).
- 35 Adicionalmente, el paso d) comprende específicamente: dividir los cultivos celulares en dos grupos según los pocillos de colonias individuales y los pocillos de colonias múltiples; clasificar el grupo de los pocillos de colonias individuales según OD₁/OD₂ de alto a bajo, y seleccionar las primeras N cepas de células, donde N es 1-20; clasificar el grupo de los pocillos de colonias múltiples según OD₁/OD₃ de alto a bajo, y seleccionar los primeros M pocillos de células para la subclonación, respectivamente, y detectar las células subclonadas según los métodos del paso a) y del paso b) y seleccionar N cepas de células con mayor OD₁/OD₂, donde M es 1-40.
- 40 Además, el paso b) comprende específicamente: detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular usando un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina; preferiblemente, el anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo se selecciona de la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y la proteína de unión a inmunoglobulina es una proteína A de Estafilococo y/o una proteína G de Estreptococo.
- 45 Además, el paso c) comprende específicamente: recubrir el antígeno objetivo en una fase sólida y detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo mediante un segundo anticuerpo.
- 50 Además, el anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-
- 55

5 tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína sérica, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea sérica, un anticuerpo anti-calcitonina sérica, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata, un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero. Además, el método comprende un cultivo de expansión del cultivo celular que contiene el anticuerpo cribado y una preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.

20 Según otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona el uso de un kit en la preparación de un par de anticuerpos, y el kit comprende: un anticuerpo de captura, que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente inmovilizado en un medio en fase sólida, el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es Fab' o F(ab)₂; y un anticuerpo marcado, que es un anticuerpo anti-fragmento cristizable; y un antígeno objetivo que se une directa o indirectamente a un medio en fase sólida; y un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina.

25 Además, el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es F(ab')₂.

Además, dicho anticuerpo marcado se marca con un marcador rastreador, que marca directa o indirectamente dicho anticuerpo marcado.

Además, dicho marcador rastreador se selecciona de al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados y un marcado radiactivo.

30 Además, dicho anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo se selecciona de la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y dicha proteína de unión a inmunoglobulina es una proteína A de Estafilococo y/o una proteína G de Estreptococo.

Además, dicha fase sólida es una placa ELISA, microesferas magnéticas u oro coloidal.

40 Además, dicho anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea, un anticuerpo anti-calcitonina, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata, un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero.

55 Además, dicho kit comprende además: los reactivos usados en el cultivo de expansión de cultivos celulares y en la preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.

Además, dicho kit se usa en un analizador de inmunoensayo semiautomático o completamente automático.

- 5 Aplicar la solución técnica de la presente solicitud, usando un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usando un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado para cribar directamente un anticuerpo objetivo que se puede emparejar con dicho anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular, sin requerir la preparación, purificación y marcado a gran escala de los anticuerpos a cribar, reduciendo así en gran medida la carga de trabajo.

Descripción de los dibujos

- 10 Los dibujos adjuntos a la descripción que constituyen parte de la presente solicitud se utilizan para proporcionar una comprensión adicional de la presente solicitud; y formas de realización ejemplificativas e ilustraciones de la misma se usan para explicar la presente solicitud, y no limitan innecesariamente la presente solicitud. En los dibujos:

La figura 1 muestra un diagrama esquemático del cribado de un anticuerpo que se puede emparejar con un anticuerpo de captura del sobrenadante de cultivo celular mediante el método sándwich según la presente solicitud;

- 15 la figura 2 muestra un diagrama esquemático de detección cuantitativa del contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular usando un método de sándwich de doble anticuerpo según la presente solicitud; y

la figura 3 muestra un diagrama esquemático de detección de la fuerza de unión de los anticuerpos a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo usando un ensayo indirecto según la presente solicitud.

20 Descripción de formas de realización específicas

Debe observarse que, en caso de no conflicto, las formas de realización de la presente solicitud y las características de las formas de realización pueden combinarse entre sí. La presente solicitud se describirá en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos y en combinación con las formas de realización.

- 25 Anticuerpos marcados: las propiedades de unión del anticuerpo se detectan en virtud del marcado de los compuestos cromogénicos tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, luminol y similares en el anticuerpo.

- 30 El segundo anticuerpo, es decir el llamado anticuerpo secundario, puede unirse específicamente al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo primario no conduce al marcado en un entorno complejo, como el sobrenadante de cultivo celular, un anticuerpo secundario puede ser incorporado para marcar los compuestos cromogénicos para la detección.

Método sándwich: un método de detección combinada de un antígeno usando un par de anticuerpos, o un método de detección combinada de un anticuerpo usando un par de anticuerpos.

- 35 Método indirecto: un método para inmovilizar el antígeno al vector en fase sólida y detectarlo con el segundo anticuerpo.

Subclonación: las células se han dispersado mediante el método de dilución limitada en células individuales para cultivo, purificando así la cepa celular.

- 40 Tecnología de biblioteca de anticuerpos en fagos: una tecnología de preparación de anticuerpos que consiste en tomar el conjunto completo de genes de la región variable de anticuerpo mediante amplificación PCR, y expresar y cribar el anticuerpo objetivo mediante la tecnología de visualización de la superficie del fago.

- 45 El cribado de anticuerpos emparejados puede ser detectado solamente basado en el método sándwich. Si hay un anticuerpo A y un antígeno X al que se une específicamente el anticuerpo A, es necesario cribar otro anticuerpo B emparejado con A y unirlo al antígeno X; entonces A y B actúan respectivamente como anticuerpo de captura y anticuerpo marcado. Si es posible la detección sándwich del antígeno, el emparejamiento es exitoso. La presente solicitud contempla cribar directamente un anticuerpo emparejado con A del sobrenadante de cultivo celular; es decir, el anticuerpo objetivo B está potencialmente presente en el sobrenadante de cultivo celular. Sin embargo, existen los siguientes dos problemas: ① dado que el sobrenadante contiene una gran cantidad de proteínas impuras, la eficiencia del emparejamiento será

- 50 extremadamente baja, independientemente del cultivo celular que se use como anticuerpo de captura o anticuerpo marcado; ② A es usado como anticuerpo de captura, y luego el cultivo celular que contiene el anticuerpo β se añade después de la captura del antígeno, y luego el anticuerpo marcado se incorpora para

unirse al anticuerpo B, y debido al alto grado de homología entre el anticuerpo A y el anticuerpo B (a menos que los dos anticuerpos se seleccionen de diferentes especies, pero esto es bastante raro), el anticuerpo marcado también puede unirse al anticuerpo A, y por lo tanto, causar falsos positivos.

- 5 La idea inventiva de la presente solicitud es la siguiente: usar el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo A como anticuerpo de captura, añadir el sobrenadante de cultivo celular que contiene el anticuerpo B después de capturar el antígeno X, y luego usar un anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado. El anticuerpo marcado se une solo al fragmento Fc del anticuerpo, por lo que se une solo a B para evitar falsos positivos. Por lo tanto, usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente (como el fragmento Fab) como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizante (como el fragmento Fc) como anticuerpo marcado para cribar directamente el anticuerpo que se puede emparejar con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular. Luego, evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en el paso anterior según el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular, o la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo.
- 10
- 15 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar un par de anticuerpos. El método comprende usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado para cribar directamente un anticuerpo objetivo que pueda emparejarse con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular.

- 20 Donde "un anticuerpo existente" se refiere a un anticuerpo preparado a cribar para emparejarlo, pero no se refiere específicamente a anticuerpos de la técnica anterior.

Aplicando la solución técnica de la presente solicitud, el sobrenadante de cultivo celular se puede cribar directamente para obtener el anticuerpo objetivo que se puede emparejar con el anticuerpo existente sin requerir la preparación, purificación y marcado a gran escala de los anticuerpos a cribar usando un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usando un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado, reduciendo así en gran medida la carga de trabajo.

25

El método sándwich usado para la detección de anticuerpos en la presente solicitud puede ser un ensayo sándwich inmunosorbente ligado a enzimas, un método sándwich de inmunoensayo quimioluminiscente u otros métodos de detección sándwich.

- 30 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab; el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc. Por supuesto en la presente solicitud el anticuerpo no se limita a un anticuerpo IgG, sino que puede ser otros tipos de anticuerpos. Por consiguiente, el anticuerpo de captura es un fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-cristalizante. El anticuerpo de captura incluye, pero no se limita a, Fab' o F(ab)₂, y más preferiblemente F(ab)₂ porque F(ab)₂ es más estable que Fab'. El anticuerpo de captura se puede obtener mediante la digestión de anticuerpos intactos con pepsina o papaína, o se puede obtener mediante un método de ingeniería genética.
- 35

- 40 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el método también comprende: optimizar el anticuerpo cribado según el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular o la fuerza de unión de un anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular a un antígeno objetivo, para obtener un anticuerpo que se empareje bien con el anticuerpo existente.

- 45 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el anticuerpo marcado se marca mediante un marcador rastreador que marca directa o indirectamente el anticuerpo marcado; preferentemente, el marcador rastreador incluye, pero no se limita a, al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados, y un marcado radiactivo.

- Preferiblemente, pasos preferidos comprenden: a) detectar el anticuerpo cribado que pueda ser emparejado con el anticuerpo de captura en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método sándwich, y registrar la señal resultante como OD₁; b) detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular y registrar la señal resultante como OD₂; c) detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo, y registrar la señal resultante como OD₃; d) evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en el paso a) basado en la OD₁/OD₂ o
- 50

- 55 La idea inventiva de la presente solicitud es la siguiente: usar el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo A como anticuerpo de captura, añadir el sobrenadante de cultivo celular que contiene el anticuerpo B después de capturar el antígeno X, y luego usar un anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado. El anticuerpo marcado se une solo al fragmento Fc del anticuerpo, por lo que se une solo a B para evitar falsos positivos. Por lo tanto, usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo

5 existente (como el fragmento Fab) como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizante (como el fragmento Fc) como anticuerpo marcado para cribar directamente el anticuerpo que se puede emparejar con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular. Luego, evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en el paso anterior según el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular, o la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo.

10 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar un par de anticuerpos. El método comprende usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado para cribar directamente un anticuerpo objetivo que pueda emparejarse con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular.

Donde "un anticuerpo existente" se refiere a un anticuerpo preparado a cribar para emparejarlo, pero no se refiere específicamente a anticuerpos de la técnica anterior.

15 Aplicando la solución técnica de la presente solicitud, el sobrenadante de cultivo celular se puede cribar directamente para obtener el anticuerpo objetivo que se puede emparejar con el anticuerpo existente sin requerir la preparación, purificación y marcado a gran escala de los anticuerpos a cribar usando un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usando un anticuerpo anti-fragmento cristalizante como anticuerpo marcado, reduciendo así en gran medida la carga de trabajo.

20 El método sándwich usado para la detección de anticuerpos en la presente solicitud puede ser un ensayo sándwich inmunosorbente ligado a enzimas, un método sándwich de inmunoensayo quimioluminiscente u otros métodos de detección sándwich.

25 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab; el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc. Por supuesto en la presente solicitud el anticuerpo es un anticuerpo IgG, pero puede ser otros tipos de anticuerpos. Por consiguiente, el anticuerpo de captura es un fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-cristalizante. El anticuerpo de captura incluye Fab' o F(ab)₂, y más preferiblemente F(ab)₂, porque F(ab)₂ es más estable que Fab'. El anticuerpo de captura se puede obtener mediante la digestión de anticuerpos intactos con pepsina o papaína, o se puede obtener mediante un método de ingeniería genética.

30 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el método también comprende: optimizar el anticuerpo cribado según el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular o la fuerza de unión de un anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular a un antígeno objetivo, para obtener un anticuerpo que se empareje bien con el anticuerpo existente.

35 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el anticuerpo marcado se marca mediante un marcador rastreador que marca directa o indirectamente el anticuerpo marcado; preferentemente, el marcador rastreador incluye al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados, y un marcado radiactivo.

40 Preferiblemente, pasos preferidos comprenden: a) detectar el anticuerpo cribado que pueda ser emparejado con el anticuerpo de captura en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método sándwich, y registrar la señal resultante como OD₁; b) detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular y registrar la señal resultante como OD₂; c) detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo, y registrar la señal resultante como OD₃; d) evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en el paso a) basado en la proporción OD₁/OD₂ o OD₁/OD₃.

45 Donde, en el paso a), el anticuerpo cribado que se puede emparejar con el anticuerpo de captura en el sobrenadante de cultivo celular se detecta mediante el método sándwich, y la señal detectada se registra como OD₁. La señal positiva indica que el cultivo celular a detectar contiene el anticuerpo que puede emparejarse con el anticuerpo existente.

50 En el paso b), siendo que la cantidad de anticuerpo efectivo en el sobrenadante de cultivo celular no es igual, la fuerte señal del medio de cultivo detectado en el paso a) puede ser el resultado de la gran cantidad de anticuerpo en lugar de un mejor efecto de emparejamiento. Por lo tanto, la presente solicitud contempla obtener el valor relativo de la cantidad de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular, y cree que el anticuerpo con un contenido total de anticuerpos efectivo más bajo pero mayor OD₁ tiene mejor efecto de emparejamiento. En este paso, se detecta el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular (solución de cultivo celular) y la señal resultante se registra como OD₂.

55 En el paso c) se detecta la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo.

En el paso d) el anticuerpo cribado en el paso a) se evalúa u optimiza basado en la proporción OD₁/OD₂ o OD₁/OD₃.

5 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el paso d) comprende: 1) si el cultivo celular es un cultivo celular de cepa celular individual, entonces el anticuerpo con mayor OD₁/OD₂ se empareja mejor con el anticuerpo existente; 2) si el cultivo celular es un cultivo celular de múltiples cepas celulares, entonces el cultivo celular con mayor OD₁/OD₃ se selecciona para separarse en células individuales para el cultivo continuo a fin de obtener nuevos cultivos celulares, y los nuevos cultivos celulares se optimizan adicionalmente enseguida al paso 1). Lo mayor es OD₁/OD₃, más la señal OD₁ que se detecta para el anticuerpo cribado está cerca de la señal OD₃ que se detecta por la fuerza de unión de este anticuerpo al antígeno objetivo, indicando que estos dos anticuerpos tienen menos interferencia entre sí, y un mejor efecto de emparejamiento.

15 Preferiblemente, el paso d) comprende específicamente: dividir los cultivos celulares en dos grupos según los pocillos de colonias individuales y los pocillos de colonias múltiples; el grupo de los pocillos de colonias individuales se clasifica según OD₁/OD₂ de alto a bajo, y se seleccionan las primeras N cepas de células, donde N es 1-20, preferentemente 10; el grupo de los pocillos de colonias múltiples se clasifica según OD₁/OD₃ de alto a bajo, y los primeros M pocillos de células se seleccionan respectivamente para la subclonación, y las células subclonadas se detectan según los métodos del paso a) y del paso b) y se seleccionan N cepas de células con mayor OD₁/OD₂, donde M es 1-40, preferiblemente 20.

20 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el paso b) comprende específicamente: detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular usando un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina; preferiblemente, el anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo incluye la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y la proteína de unión a inmunoglobulina incluye una proteína A de *Estafilococo* y/o una proteína G de *Streptococo*. El anticuerpo que se une específicamente a la región conservada de anticuerpo que se usa en este paso se selecciona de la mezcla de dos o más cepas de los anticuerpos descritos anteriormente.

30 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el paso c) utiliza un método indirecto para detectar la unión de solo el anticuerpo en el cultivo y el antígeno, y comprende específicamente: recubrir el antígeno objetivo en una fase sólida y detectar la fuerza de unión del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo por medio de un segundo anticuerpo. En la detección del método indirecto, solo el anticuerpo en el cultivo se une al antígeno, que es diferente del efecto del impedimento estérico de otro anticuerpo en el método sándwich. Por lo tanto, la intensidad de la señal detectada en el método indirecto es teóricamente más alta que la del método sándwich. Cuando los dos valores son equivalentes, estos dos anticuerpos no se afectan entre sí para unirse al antígeno, y el efecto de emparejamiento es el mejor (en la operación real, debido a la diferencia ambiental de la detección, es deseable comparar la proporción de valor obtenida en el método sándwich a la obtenida en el método indirecto).

45 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea, un anticuerpo anti-calcitonina, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata, un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero.

60 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el método comprende también un cultivo de expansión del cultivo celular que contiene el anticuerpo cribado y una preparación y purificación a gran

escala del anticuerpo objetivo.

5 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, se proporciona el uso de un kit en la preparación de un par de anticuerpos. El kit comprende un anticuerpo de captura formado inmovilizando el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente en un medio en fase sólida y un anticuerpo anti-fragmento cristalizante usado como anticuerpo marcado, que se usan para cribar directamente un anticuerpo objetivo que se puede emparejar con el anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular.

10 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab; el anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc. Por supuesto en la presente solicitud, el anticuerpo es un anticuerpo Ig, pero puede ser otros tipos de anticuerpo. Por consiguiente, el anticuerpo de captura es el fragmento de unión a antígeno y el anticuerpo marcado es el anticuerpo anti-cristalizante del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo de captura es Fab' o F(ab)₂, y más preferiblemente F(ab)₂, porque F(ab)₂ es más estable que Fab'. El anticuerpo de captura se puede obtener mediante la digestión de anticuerpos intactos con pepsina o papaína, o se puede obtener mediante un método de ingeniería genética.

15 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el anticuerpo marcado se marca mediante un marcador rastreador que marca directa o indirectamente el anticuerpo marcado; preferentemente, el marcador rastreador se selecciona de al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados, y un marcado radiactivo.

20 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el kit comprende también: un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina, usada para detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular: preferiblemente, el anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo incluye la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y la proteína de unión a inmunoglobulina incluye una proteína A de Estafilococo y/o una proteína G de Estreptococo.

25 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el kit comprende también: un antígeno objetivo que se une directa o indirectamente al medio en fase sólida, para detectar la fuerza de unión solo del anticuerpo en el cultivo con el antígeno por medio de un segundo anticuerpo utilizando el método indirecto.

30 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, la fase sólida es una placa ELISA, microesferas magnéticas u oro coloidal.

35 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína sérica, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea sérica, un anticuerpo anti-calcitonina sérica, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata, un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero.

45 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el kit comprende también: los reactivos usados en un cultivo de expansión de cultivos celulares y en una preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.

50 Según una forma de realización típica de la presente solicitud, el kit comprende también: los reactivos usados en un cultivo de expansión de cultivos celulares y en una preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.

55 Específicamente, en una forma de realización típica de la presente solicitud, un método para preparar eficientemente un par de anticuerpos usando un fragmento Fab de un anticuerpo altamente sensible como anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-Fc como anticuerpo marcado es como en los siguientes pasos:

5 a) Como se muestra en la figura 1, usando el fragmento Fab del anticuerpo de alta sensibilidad existente como anticuerpo de captura 10, y usando el anticuerpo anti-Fc como anticuerpo marcado 40 (que lleva una marca 50), del sobrenadante de cultivo celular cribar directamente el anticuerpo 30 (20 es el antígeno) que puede ser emparejado con el anticuerpo de captura mediante el método sándwich, y la señal detectada mediante el método sándwich se registra como OD₁;

10 b) Como se muestra en la figura 2, el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular se detecta cuantitativamente utilizando un método sándwich de doble anticuerpos, es decir el contenido total de anticuerpos 80 en el sobrenadante de cultivo celular se detecta mediante el método sándwich usando dos anticuerpos que se unen específicamente a la región conservada de anticuerpos (el segundo anticuerpo A 60 y el segundo anticuerpo B 70), y la señal resultante se registra como OD₂;

incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos, y 50 µl de 2 M H₂SO₄ fueron añadidos para terminar la reacción. Se midió la absorción a una longitud de onda de 450 nm.

Efecto de recubrimiento de Fab' y F(ab)₂

15 El anticuerpo anti-TPO T-1 y Fab' y F(ab)₂ de los mismos fueron usados para recubrir las placas ELISA para examinar su emparejamiento con el anticuerpo T-2. Se usó el ELISA sándwich para detectar los antígenos TPO con diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación (detección del emparejamiento de T-1 y Fab' y F(ab)₂ del mismo con T-2):

Tabla 1

	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Fab'	1,96	2,65	2,74
F(ab) ₂	2,98	3,42	3,67
T-1	3,09	3,64	3,78
Nota: Los datos en la tabla indican OD ₄₅₀ y el valor de fondo de detección (en la misma condición a excepción de la ausencia de antígeno) es inferior a 0,2.			

20 El anticuerpo anti-TPO T-1 y Fab' y F(ab)₂ de los mismos fueron usados para recubrir las placas ELISA. Se usó el anticuerpo IgG Fc anti-ratón de cabra como segundo anticuerpo en ELISA, y se examinó el emparejamiento de tres formas de anticuerpo T-1 con el anticuerpo T-2 en el sobrenadante de cultivo celular. Se usó el ELISA sándwich para detectar los antígenos TPO con diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación (detección del emparejamiento de T-1 y Fab' y F(ab)₂ del mismo con T-2 en el sobrenadante de cultivo celular):

25 Tabla 2

	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Fab'	1,46	2,33	2,65
F(ab) ₂	2,45	3,02	3,64
T-1	3,85	3,79	3,83
Nota: Los datos en la tabla indican OD ₄₅₀ y el valor de fondo de detección (en la misma condición a excepción de la ausencia de antígeno) es inferior a 0,2.			

Ejemplo 2

Preparación del par de anticuerpos anti-gastrina-17

30 La gastrina-17 (G17) es un polipéptido con 17 aminoácidos y es de gran importancia para el diagnóstico de tumores y enfermedades gástricas. En la técnica se recomienda el método sándwich de doble anticuerpos, pero esta molécula es demasiado pequeña, la preparación de un par de anticuerpos tiene una dificultad relativamente alta. En los estudios anteriores, los inventores de la presente solicitud adquirieron un anticuerpo monoclonal G-1 derivado de ratón que tiene una afinidad extremadamente alta con G17. En el presente ejemplo se prepararon los anticuerpos emparejados de G-1 (subtipo IgG).

1) Adquisición de F(ab)₂

Se hace referencia al método proporcionado por Short Protocols in Immunology (John E. Coligan, USA, 2009) para usar la digestión con pepsina. Específicamente, se dializaron 2 ml de G-1 purificado de 3 mg/ml contra 200 ml de tapón de ácido acético (pH 4,0) a 4 °C durante 4 oras, la concentración se volvió a medir y se ajustó a 2 mg/ml usando tapón de acetato con el mismo pH. La concentración de pepsina de 0,1 mg/ml se formuló con el tapón de acetato (pH 4.0), y se añadió 1 ml de la solución a la solución de anticuerpo descrita anteriormente para hacer que la enzima al anticuerpo de 1: 20 reaccione a 37 °C durante 4 horas. La reacción se terminó mediante la adición de 100 µl de 2 mol/l de base Tris. La mezcla se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra 1 l de PBS de pH 8.0 a 4 °C. El dializado se cargó en una columna cromatográfica CL-4B de gel de agarosa reticulado de proteína A de 5 mm x 100 mm y se recogió el efluente no unido. El efluente se concentró a 4 ml y se cargó en una columna cromatográfica Superfine S-200 de poliacrilamida dextrano de 26 mm x 900 mm para recoger el componente con un peso molecular de 110 kDa. El producto descrito anteriormente se identificó usando electroforesis en gel de poliacrilamida no reductora SDS al 10%, que mostró una banda solo a 110 kDa, se mostró una sola banda a 25 kDa usando electroforesis en gel de poliacrilamida no reductora. Se detectó A280 para determinar la concentración final de F(ab)₂.

2) Cribado de los anticuerpos que pueden emparejarse con G-1 mediante el método ELISA sándwich

Los ratones Balb/c maduros inmunizados con G17-KLH fueron provocados mediante inyección intraperitoneal de 300 µg de conjugado G17-KLH con tres días de antelación. Las células del bazo se cosecharon y se molieron para obtener linfocitos, y la fusión celular de linfocitos y células de mieloma de ratones sp2/0 se facilitó usando PEG1500. Se pusieron en 20 piezas de placas de cultivo celular de 96 pocillos después de la fusión. Se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 7 días, se reemplazó el medio fresco (80% RPMI1640, 20% suero bovino fetal) y se cultivaron durante otro día.

La solución G-1 F(ab)₂ se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6 y se añadió a 20 piezas de placas ELISA de 96 pocillos a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, se lavó con PBST (conteniendo Tween-20 al 0,05% en tapón PBS, pH 7.4). Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1% para incubar a 37 °C durante 2 horas para bloquear el sitio no reaccionado en la placa ELISA y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 50 µl de antígeno G17 de 1 ng/ml y 50 µl de solución de cultivo celular a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG Fc anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₁. Cultivos celulares con OD₁ > 1,5 fueron sometidos a la detección de los siguientes dos pasos.

3) Detectar las cantidades relativas de anticuerpos totales en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método ELISA sándwich de doble anticuerpo.

La mezcla de anticuerpo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 anti-ratón de cabra (sin cruzamientos entre sí) se diluyó a 2 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6. Fueron añadidos a placas ELISA a 100 µl/pocillo, incubados a 4 °C durante 12 horas, se lavó con PBST (que contenía Tween-20 al 0,05% en tapón PBS, pH 7.4). Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 100 µl de la solución de cultivo celular (diluida 10 veces con PBS) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₂.

4) Detectar la fuerza de unión del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno mediante el método ELISA indirecto.

El antígeno G17 (un conjugado de G17 y BSA) se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato con pH 9.6, se añadió a placas ELISA a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 100 µl de la solución de cultivo celular (diluida 10 veces con PBS) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y 50 µl de 2 M H₂SO₄ fueron añadidos para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₃.

ES 2 799 175 T3

5) Detección y subclonación de células y la preparación a gran escala del anticuerpo objetivo

Las células cultivadas se dividieron en dos grupos según los pocillos de colonias individuales y los pocillos de colonias múltiples. El primer grupo se clasificó según OD₁/OD₂ de alto a bajo, preferiblemente las primeras diez cepas de células (llamadas GS1-GS10 en sucesión) fueron sometidas a un cultivo de expansión.

5

El segundo grupo se clasificó según OD₁/OD₃ de alto a bajo, y las primeras células de 20 pocillos fueron sujetas a subclonación, respectivamente. Las células subclonadas se detectaron según los métodos de 1) y 3), y diez células con mayor OD₁/OD₂ fueron seleccionadas (llamadas GP1-GP10 en sucesión) para ser sujetas a un cultivo de expansión.

10

A un lote de ratones Balb/c fueron inyectados intra-peritonealmente 500 µl de adyuvante incompleto de Freund con 7 días de antelación, y a cada ratón fueron inyectadas $0,5 \times 10^6$ células de hibridoma de un cultivo de expansión. Se recogieron ascitis de ratones después de siete días de alimentación y el anticuerpo se purificó mediante el método de ácido n-caprílico - sulfato de amonio.

6) El efecto de aplicación de pares de anticuerpos

15

Se seleccionaron dos sistemas de detección para evaluar los pares de anticuerpos obtenidos.

Plataforma ELISA: se usó 1 µg/ml de G-1 para recubrir las placas ELISA, el anticuerpo recién seleccionado se marcó con HRP y se diluyó con PBS a 0,1 µg/ml, y se detectó el antígeno G17 mediante el método de sándwich para evaluar el efecto de emparejamiento.

20

Específicamente, el anticuerpo previamente cribado se marcó con HRP usando el método de marcado del anticuerpo T2 en el Ejemplo 1. El anticuerpo G-1 se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6. Fueron añadidos a placas ELISA a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 200 µl de OVA al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 50 µl de antígeno G17 de 0,1 ng/ml y 50 µl de anticuerpo recién preparado marcado con HRP de 0,1 µg/ml a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. Se midió la absorción a una longitud de onda de 450 nm.

25

Plataforma CLIA: se usó G-1 para recubrir las microesferas magnéticas en una relación de masa de 1: 100, y el anticuerpo recién cribado se marcó con ABEI, y se detectó una concentración diferente de G17 mediante el método sándwich para evaluar el efecto de emparejamiento.

30

Específicamente, se trajeron 2 mg del anticuerpo cribado a 200 µl de tapón de unión (0,1 mol/l de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico, pH 4.5), se disolvieron 2 mg de ABEI en 500 µl de tapón de unión, y las dos soluciones fueron mezcladas; se pesaron 10 mg de EDC (carburo de dietilamina) y se añadieron al agua súper pura, y se añadieron inmediatamente 100 µl de la solución a la mezcla de anticuerpos ABEI en el último paso, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto se dializó contra 4 l de PBS a 4 °C durante 8 horas, hasta completar el marcado. Se pesó 1 mg de anticuerpo G-1 y 100 mg de microesferas magnéticas en PBS, se mezclaron y se incubó a 40 °C durante 2 horas para completar el proceso de recubrimiento. Se añadieron 20 µg de microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpo G-1 a la copa de reacción del instrumento de luminiscencia bioquímica completamente automático Maglumi 2000, luego se añadieron 100 µl de antígeno G17 0,1 ng/ml y 100 µl de anticuerpo marcado con ABEI para la reacción a 37 °C durante 10 minutos. Se usó una solución de limpieza para lavar tres veces, 100 µl de sustrato A (NaOH) y sustrato B (H₂O₂) se añadieron e inmediatamente se enviaron a la cámara de medición para medir la intensidad luminosa relativa Rlu.

35

40

Los resultados del emparejamiento de 20 anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 2 con G-1

45

A través de la evaluación preliminar de F(ab)₂ y IgG Fc anti-ratón de cabra, obtuvimos 371 pocillos de células con OD₄₅₀ > 1,5, donde 63 pocillos de células eran colonias individuales (agregados de células individuales formadas por una división de crecimiento celular) y los 308 pocillos restantes de células eran colonias múltiples. Se seleccionaron 10 cepas de células S1-S10 de los 63 pocillos de colonias individuales a través de la clasificación según OD₁/OD₂; se seleccionaron 20 cepas de células de los 278 pocillos de colonias múltiples a través de la clasificación según OD₁/OD₃, y además se seleccionaron 10 cepas de células P1-P10 clasificándolas según OD₁/OD₂ después de la subclonación.

50

G-1 fue diluido a 1 µg/ml usando CBS (pH 9.6), 100 µl del cual se tomaron para recubrir las placas ELISA, GS1-GS10 y GP1-GP10 se marcaron con HRP, se añadieron 100 µl a cada pocillo a 0,1 µg/ml, y se detectaron 100 pg/ml de antígeno G17 mediante el método ELISA sándwich. Los resultados mostraron que todos los anticuerpos estaban bien emparejados con G-1, y todos los OD₄₅₀ eran mayores que 2,5 excepto

ES 2 799 175 T3

por GS7, GS8, GS9 y GS10.

La Tabla 3 muestra el emparejamiento de GS1-GS10, GP1-GP10 con G-1 evaluado mediante el método ELISA sándwich.

Tabla 3

La concentración de antígeno	GS1	GS2	GS3	GS4	GS5
100 pg/ml	3,29	3,31	3,12	2,71	2,76
	GS6	GS7	GS8	GS9	GS10
100 pg/ml	2,56	2,47	2,25	2,08	2,14
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
100 pg/ml	3,43	3,52	3,38	3,34	3,32
	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10
100 pg/ml	3,25	3,02	2,96	2,83	2,91
Nota: Los datos en la tabla indican OD ₄₅₀ y el valor de fondo de detección (en la misma condición a excepción de la ausencia de antígeno) es inferior a 0,2.					

- 5 Se usó G-1 para recubrir las microesferas magnéticas producidas por la compañía Snibe, GS1-GS10 y GP1-GP10 se marcaron con ABEI, y se detectaron 100 pg/ml de antígeno G17 mediante el método sándwich usando el sistema Maglumi de Snibe. Los resultados muestran que GS2, GP1 y GP8 se emparejaron bien con G1, entre los cuales GS2 y GP1 tuvieron el mejor efecto.

- 10 La Tabla 4 muestra el emparejamiento de GS1-GS10, GP1-GP10 con G-1 evaluado mediante el método CLIA sándwich.

Tabla 4

La concentración de antígeno	GS1	GS2	GS3	GS4	GS5
0 pg/ml	809	2430	5240	30907	18973
100 pg/ml	43802	1107631	23464	58573	19645
	GS6	GS7	GS8	GS9	GS10
0 pg/ml	3972	13451	3451	8512	5634
100 pg/ml	8716	22142	5632	14421	6421
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
0 pg/ml	2871	14512	16752	12133	13763
100 pg/ml	1386542	56214	47532	245231	21765
	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10
0 pg/ml	8965	5674	3747	16785	1652
100 pg/ml	13341	8532	464673	18551	2043
Nota: Los datos en la Tabla 4 indican la intensidad de luminiscencia relativa.					

Ejemplo 3

La preparación del par de anticuerpos de anti-proteína de unión a folato.

ES 2 799 175 T3

La proteína de unión a ácido fólico (FABP), también conocida como proteína receptora del ácido fólico, juega un papel importante en la división, proliferación y campo de sonido celular, y generalmente se detecta mediante el método sándwich de doble anticuerpos. En el trabajo anterior obtuvimos un anticuerpo F-1 con una afinidad relativamente alta por FABP. En este ejemplo, prepararemos el anticuerpo de emparejamiento de F-1.

5

1) Adquisición de F(ab)₂

Se dializaron 2 ml de F-1 purificado de 3 mg/ml contra 200 ml de tapón de ácido acético (pH 4.0) a 4 °C durante 4 horas, la concentración se volvió a medir y se ajustó a 2 mg/ml usando tapón de acetato con mismo pH. La concentración de pepsina de 0,1 mg/ml se formuló con el tapón de acetato (pH 4.0), y se añadió 1 ml de la solución a la solución de anticuerpo descrita anteriormente para hacer que la enzima al anticuerpo de 1: 20 reaccione a 37 °C durante 4 horas. La reacción se terminó mediante la adición de 100 µl de 2 mol/l de base Tris. La mezcla se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra 1 l de PBS de pH 8.0 a 4 °C. El dializado se cargó en una columna cromatográfica CL-4B de gel de agarosa reticulado de proteína A de 5 mm x 100 mm y se recogió el efluente no unido. El efluente se concentró a 4 ml y se cargó en una columna cromatográfica Superfine S-200 de poliacrilamida dextrano de 26 mm x 900 mm para recoger el componente con un peso molecular de 110 kDa. El producto descrito anteriormente se identificó usando electroforesis en gel de poliacrilamida no reductora SDS al 10%, que mostró una banda solo a 110 kDa, se mostró una sola banda a 25 kDa usando electroforesis en gel de poliacrilamida no reductora. Se detectó A280 para determinar la concentración final de F(ab)₂.

10

15

20

2) Cribado de los anticuerpos que pueden emparejarse con F-1 mediante el método ELISA sándwich

Los ratones Balb/c maduros inmunizados con FABP fueron provocados mediante inyección intraperitoneal de 300 µg de FABP con tres días de antelación. Las células del bazo se cosecharon y se molieron para obtener linfocitos, y la fusión celular de linfocitos y células de mieloma de ratones sp2/0 se facilitó usando PEG1500. Se pusieron en 20 piezas de placas de cultivo celular de 96 pocillos después de la fusión. Se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 7 días, se reemplazó el medio fresco (80% RPMI1640, 20% suero bovino fetal) y se cultivaron durante otro día.

25

La solución F-1 F(ab)₂ se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6 y se añadió a 20 piezas de placas ELISA de 96 pocillos a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, y se lavó con PBST (conteniendo Tween-20 al 0,05% en tapón PBS, pH 7.4). Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1% para incubar a 37 °C durante 2 horas para bloquear el sitio no reaccionado en la placa ELISA y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 50 µl de antígeno FABP y 50 ng/ml y 50 µl de solución de cultivo celular a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG Fc anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₁. Cultivos celulares con OD₁ > 1,5 fueron sometidos a la detección de los siguientes dos pasos.

30

35

3) Detectar la cantidad relativa de anticuerpos totales en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método ELISA sándwich de doble anticuerpo

La mezcla de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 anti-ratón de cabra (sin cruzamiento entre sí) se diluyó a 2 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6. Fueron añadidos a placas ELISA a 100 µl/pocillo, incubados a 4 °C durante 12 horas, y se lavó con PBST (que contenía Tween-20 al 0,05% en tapón PBS, pH 7.4). Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 100 µl de la solución de cultivo celular (diluida 10 veces con PBS) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y 50 µl de 2 M H₂SO₄ fueron añadidos para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₂.

40

45

50

4) Detectar la fuerza de unión del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular al antígeno mediante el método ELISA indirecto.

El antígeno FABP se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6. Fueron añadidos a placas ELISA a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 100 µl de la solución de cultivo celular (diluida 10 veces con PBS) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se

55

ES 2 799 175 T3

añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. La absorción a una longitud de onda de 450 nm se midió y registró como OD₃.

5) Detección y subclonación de células y la preparación a gran escala del anticuerpo objetivo

5 Las células cultivadas se dividieron en dos grupos según los pocillos de colonias individuales y los pocillos de colonias múltiples. El primer grupo se clasificó según OD₁/OD₂ de alto a bajo, preferiblemente las primeras diez cepas de células (llamadas FS1-FS10 en sucesión) fueron sometidas a un cultivo de expansión.

10 El segundo grupo se clasificó según OD₁/OD₃ de alto a bajo, y las primeras células de 20 pocillos fueron sujetas a subclonación, respectivamente. Las células subclonadas se detectaron según los métodos de 1) y 3), y diez células con mayor OD₁/OD₂ fueron seleccionadas (llamadas FP1-FP10 en sucesión) para ser sujetas a un cultivo de expansión.

15 A un lote de ratones Balb/c fueron inyectados intra-peritonealmente 500 µl de adyuvante incompleto de Freund con 7 días de antelación, y a cada ratón fueron inyectadas 0,5 × 10⁶ células de hibridoma de cultivo de expansión. Se recogieron ascitis de ratones después de siete días de alimentación y el anticuerpo se purificó mediante el método de ácido n-caprílico - sulfato de amonio.

6) El efecto de aplicación de pares de anticuerpos

Hemos seleccionado dos sistemas de detección para evaluar los pares de anticuerpos obtenidos.

20 Plataforma ELISA: se usó 1 µg/ml de F-1 para recubrir las placas ELISA, el anticuerpo recién seleccionado se marcó con HRP y se diluyó con PBS a 0,1 µg/ml, y se detectó el antígeno FABP mediante el método de sándwich para evaluar el efecto de emparejamiento.

25 Específicamente, el anticuerpo previamente cribado se marcó con HRP usando el método de marcado del anticuerpo T2 en el Ejemplo 1. El anticuerpo F-1 se diluyó a 1 µg/ml con un tapón de carbonato de pH 9.6. Fueron añadidos a placas ELISA a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 200 µl de OVA al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 50 µl de FABP de 50 ng/ml y 50 µl de anticuerpo recién preparado marcado con HRP de 0,1 µg/ml a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. Se midió la absorción a una longitud de onda de 450 nm.

30 Plataforma CLIA: se usó F-1 para recubrir las microesferas magnéticas en una relación de masa de 1: 100, y el nuevo anticuerpo FS1-FS10 y FP1-FP10 se marcó con ABEI, y el antígeno FABP se detectó mediante el método sándwich para evaluar el efecto de emparejamiento.

35 Específicamente, se trajeron 2 mg del anticuerpo cribado a 200 µl de tapón de unión (0,1 mol/l de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico, pH 4.5), se disolvieron 2 mg de ABEI en 500 µl de tapón de unión, y las dos soluciones fueron mezcladas; se pesaron 10 mg de EDC (carburo de dietilamina) y se añadieron al agua súper pura, y se añadieron inmediatamente 100 µl de la solución a la mezcla de anticuerpos ABEI obtenida en el último paso, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto se dializó contra 4 l de PBS a 4 °C durante 8 horas, hasta completar el marcado. Se pesó 1 mg de anticuerpo F-1 y 100 mg de microesferas magnéticas producidas por la compañía Snibe y se añadieron a PBS para mezclar, y se incubó a 40 °C durante 2 horas para completar el proceso de recubrimiento. Las microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpo F-1 se cargaron en la copa de reacción usando el instrumento de luminiscencia bioquímica completamente automático Maglumi, y luego se añadieron 100 µl de FABP de 50 ng/ml y 100 µl de anticuerpo marcado con ABEI para la reacción a 37 °C durante 10 minutos. Se usó una solución de limpieza para lavar tres veces, 100 µl de sustrato A (NaOH) y sustrato B (H₂O₂) se añadieron e inmediatamente se enviaron a la cámara de medición para medir la intensidad luminosa relativa Rlu.

Los resultados del emparejamiento de los 20 anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 3 con F-1

50 A través de la evaluación preliminar de F(ab)₂ y IgG Fc anti-ratón de cabra, obtuvimos 480 pocillos de células con OD₄₅₀ > 1,5, donde 72 pocillos de células eran colonias individuales (agregados de células individuales formadas por una división de crecimiento celular) y los 408 pocillos restantes de células eran colonias múltiples. Se seleccionaron 10 cepas de células FS1-FS10 de los 72 pocillos de colonias individuales a través de la clasificación según OD₁/OD₂; se seleccionaron 20 cepas de células de 408 pocillos de colonias múltiples a través de la clasificación según OD₁/OD₃, y 10 cepas de células FP1-FP10 se seleccionaron adicionalmente clasificándolas según OD₁/OD₂ después de la subclonación.

ES 2 799 175 T3

- 5 F-1 se diluyó a 1 µg/ml usando CBS (pH 9.6), 100 µl del cual se tomaron para recubrir las placas ELISA, FS1-FS10 y FP1-FP10 se marcaron con HRP y se diluyeron a 0,1 µg/ml usando PBS, 100 µl de los cuales se añadieron a cada pocillo, y se detectaron 50 ng/ml de FABP mediante el método ELISA sándwich. Los resultados mostraron que todos los anticuerpos estaban bien emparejados con F-1, y todos los OD₄₅₀ eran mayores que 2,5 excepto por GS7, GS8, GS9 y GS10.

La Tabla 5 muestra el emparejamiento de FS1-FS10 y FP1-FP10 con F-1 evaluado mediante el método ELISA sándwich.

Tabla 5

La concentración de antígeno	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5
50 ng/ml	3,82	3,56	3,11	2,65	2,78
	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10
50 ng/ml	2,68	2,52	2,32	2,41	2,14
	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
50 ng/ml	3,75	3,82	3,85	3,46	3,65
	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10
50 ng/ml	3,55	3,46	2,98	3,07	3,11

Nota: Los datos en la tabla indican OD₄₅₀ y el valor de fondo de detección (en la misma condición a excepción de la ausencia de antígeno) es inferior a 0,2.

- 10 Se usó F-1 para recubrir las microesferas magnéticas producidas por la compañía Snibe, FS1-FS10 y FP1-FP10 se marcaron con ABEI, y se detectaron 50 ng/ml de antígeno FABP mediante el método sándwich en el sistema Maglumi. Los resultados mostraron que FS-3, FP-1, FP-2, FP-5 y FP-7 se emparejaron bien con F-1, entre los cuales FS-3, FP-1 y FP-7 tuvieron el mejor efecto.

La Tabla 6 muestra el emparejamiento de FS1-FS10 y FP1-FP10 con F-1 evaluado en la plataforma CLIA.

Tabla 6

La concentración de antígeno	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5
0 pg/ml	5896	12474	8672	35278	6788
50 ng/ml	173110	214054	1836981	82578	124274
	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10
0 pg/ml	8677	12571	8674	6587	5874
50 ng/ml	65814	24157	10254	6438	9375
	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5
0 pg/ml	5387	28797	16975	6837	7854
50 ng/ml	1987752	988725	268774	367784	1355789
	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10
0 pg/ml	24875	8074	8982	12745	4387
50 ng/ml	687724	1386489	35047	254774	82449

Nota: Los datos en la Tabla 4 indican la intensidad de luminiscencia relativa.
--

Ejemplo comparativo 4

Pares de anticuerpos FABP se prepararon usando el método comúnmente usado

5 Las estrategias comúnmente usadas son el método de preparación de pares de anticuerpos descrito en la referencia "The preparation of anti-human alpha-fetoprotein monoclonal antibody and the establishment of double antibody sandwich ELISA detection technology, Sun Yifan, Chinese Medicinal Biotechnology, agosto 2014, vol. 9, N° 4".

1) Adquisición de células de hibridoma

10 Los ratones Balb/c maduros inmunizados con FABP fueron provocados mediante inyección intraperitoneal de 300 µg de FABP con tres días de antelación. Las células del bazo se cosecharon y se molieron para obtener linfocitos, y la fusión celular de linfocitos y células de mieloma de ratones sp2/0 se facilitó usando PEG1500. Se pusieron en 10 piezas de placas de cultivo celular de 96 pocillos después de la fusión. Se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 7 días, se reemplazó el medio fresco (80% RPMI1640, 20% suero bovino fetal) y se cultivaron durante otro día.

2) Cribado de los anticuerpos que se unen a antígenos FABP

15 El FABP se diluyó a 1 µg/ml usando un tapón de carbonato de pH 9.6 y se añadió a las placas ELISA a 100 µl/pocillo, se incubó a 4 °C durante 12 horas, y se lavó tres veces con PBST (que contenía Tween-20 al 0,05% en tapón PBS, pH 7.4). Se añadieron 200 µl de OVA (ovoalbúmina) al 1%, se incubó a 37 °C durante 2 horas, y se lavó una vez con PBST. Se añadieron 100 µl de la solución de cultivo celular descrita anteriormente (diluida 10 veces con PBS) a cada pocillo, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP de 0,1 µg/ml, se incubó a 37 °C durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 100 µl de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 50 µl de 2 M H₂SO₄ para terminar la reacción. Se midió la absorción a una longitud de onda de 450 nm. Se seleccionaron células de 20 pocillos según la absorción de alto a bajo.

25 3) Cribado de anticuerpos emparejados

Se subclonaron veinte cepas de células, y las cepas celulares individuales se aislaron y se sometieron a un cultivo de expansión. Se obtuvo una gran cantidad de anticuerpos secretados por cada cepa celular como en el Ejemplo 1, y los 20 anticuerpos obtenidos fueron llamados FE1-FE20 en sucesión.

30 Un total de 21 anticuerpos de FE1-FE20 y F-1 se combinaron en pares (también se pueden auto-combinar), formando 441 (21 × 21) combinaciones. En un par de anticuerpos de estas combinaciones, uno fue usado para recubrir la placa ELISA y otro se marcó con HRP. Los antígenos FABP fueron detectados a través del método ELISA sándwich. Se detectaron las células con resultados positivos (OD₄₅₀ > pocillos de control negativo ± doble varianza, los pocillos de control negativo son todos iguales a excepción de la ausencia de antígeno). El procedimiento de marcado y detección es el mismo que el del Ejemplo 3.

35 4) El efecto de aplicación de pares de anticuerpos

40 Usando el método sándwich CLIA, los pares de anticuerpos exitosos de emparejamiento se probaron también para emparejamiento contra el sistema Maglumi de la compañía Snibe. Específicamente, usando el método del Ejemplo 3, se usó uno de un par de anticuerpos para recubrir las microesferas magnéticas producidas por Snibe y otro se marcó con ABEI. El FABP se detectó utilizando el método sándwich Maglumi 2000 para realizar la evaluación.

Los resultados del emparejamiento de los 20 anticuerpos obtenidos en el ejemplo comparativo.

45 Se cribaron 1321 pocillos de células mediante el método indirecto y se detectó que eran positivas (DO₄₅₀ > 1,5), y entre las cuales se seleccionaron 20 cepas con un valor de unión relativamente alto para la detección por pares. Un total de 21 anticuerpos de FE1-FE20 y F-1 se abinaron en pares en 441 grupos. Un anticuerpo de cada grupo se marcó con HRP y otro se usó para recubrir la placa ELISA. Se detectaron 50 ng/ml de FABP mediante el método ELISA sándwich. Los resultados del emparejamiento mostraron que había 62 combinaciones con OD₄₅₀ > 1,5, de las cuales solo 6 combinaciones tenían OD₄₅₀ > 2,5: FE2/FE12, FE2/FE17, FE5/FE13, FE7/FE14, FE8/FE18 y FE10/F-1.

La Tabla 7 muestra el cribado de pares de anticuerpos anti-FABP usando el método convencional.

Tabla 7

	FE12	FE13	FE14	FE17	FE18	F-1
FE2	2,84	0,21	0,13	3,01	0,74	0,67
FE5	0,24	2,69	0,29	0,18	0,67	1,67
FE7	0,28	0,67	2,98	0,21	0,32	0,43
FE8	0,11	0,18	0,26	0,19	2,56	0,58
FE10	0,28	0,07	0,18	0,24	0,47	3,12

5 Cada uno de los seis pares de anticuerpos anteriores se marcó con ABEI y se usó para recubrir las microesferas magnéticas, respectivamente, y se detectaron 50 ng/ml de antígeno FABP mediante el método sándwich en Maglumi 2000. Los resultados mostraron que solo FE2/FE17 estaba emparejado hasta cierto punto, y los otros pares de anticuerpos no eran adecuados para el sistema Maglumi.

La Tabla 8 muestra la evaluación del emparejamiento de seis pares de anticuerpos mediante el método sándwich CLIA.

Tabla 8

	FE2/ FE12	FE2/ FE17	FE5/ FE13	FE7/ FE14	FE8/ FE18	FE10/ F-1
0 pg/ml	12841	8941	6874	5681	6624	12571
50 ng/ml	26574	541001	12574	9824	8974	35714

Análisis de resultados

10 Como se puede ver en la Tabla 1 en el Ejemplo 1, el anticuerpo T-1 podría continuar emparejándose con T-2 para la detección mediante sándwich del antígeno TPO después de digerirse en el fragmento Fab' y F(ab)₂ por enzima, donde el efecto de emparejamiento de F(ab)₂ estuvo cerca de lo del anticuerpo intacto. En la Tabla 2, el anticuerpo T-2 estuvo presente en el sobrenadante de cultivo celular. El IgG Fc anti-ratón de cabra marcado con HRP se usó como segundo anticuerpo. Si el T-1 intacto se había usado como anticuerpo de captura, dado que T-1 y T-2 tienen el mismo fragmento Fc, el segundo anticuerpo reaccionaba con ambos. El valor de detección no se redujo con la disminución de la adición del antígeno, por lo tanto no puede reflejar el emparejamiento verdadero. Sin embargo, si el fragmento Fab' y F(ab)₂ fueron usados como anticuerpo de captura, los valores de detección fueron relativamente altos y se redujeron con la disminución de la adición del antígeno, lo que indica que tanto el fragmento Fab' como F(ab)₂ de T-1 se emparejaron bien con el anticuerpo T-2 en el sobrenadante de cultivo celular y pudieron detectarse bien. Como la estabilidad de F(ab)₂ fue mejor que la del Fab' monovalente, eso refleja el mejor efecto de emparejamiento. Resumiendo, usando el fragmento Fab' y F(ab)₂ de un anticuerpo como el anticuerpo de captura, es posible cribar directamente el anticuerpo del sobrenadante de cultivo celular con el que eso está emparejado.

25 De los Ejemplos 2 y 3, se descubrió que todos los anticuerpos cribados podían ser usados en el método ELISA sándwich, y la fuerza de emparejamiento era aproximadamente acorde con el orden de clasificación durante el cribado, lo que indica que la estrategia optimizada era razonable. De las Tablas 2 y 4, se descubrió que los anticuerpos resultantes después de dos ciclos de cribado (GP1-GP10 y FP1-FP10) eran superiores a los del cribado en un solo ciclo (GS1-GS10 y FS1-FS10), lo que indica que la tasa de éxito del emparejamiento mejoró en cierta medida a través del cribado en dos ciclos de OD₁/OD₃ y OD₁/OD₂ con respecto al cribado en un ciclo de OD₁/OD₂.

35 El cribado se realizó usando todas las colonias celulares (5.000-10.000) de una fusión celular mediante el método sándwich en el Ejemplo 3 y se obtuvieron 408 pocillos de células. Todas las 20 cepas celulares a través del cribado pueden combinarse con el anticuerpo F-1 de alta sensibilidad existente para usarse en el método ELISA sándwich, entre las cuales cinco cepas pueden combinarse con F-1 para usarse en el método CLIA sándwich. El Ejemplo comparativo primero cribó 20 anticuerpos que pueden unirse al antígeno, y luego estos anticuerpos se prepararon a gran escala, se purificaron y se marcaron con HRP. Solo seis pares de anticuerpos que pueden usarse en el método ELISA sándwich se cribaron de las 441 combinaciones mediante el método de tablero de ajedrez (chessboard), entre los cuales se puede usar un par de anticuerpos en el método sándwich CLIA.

40 El método por el cual el anticuerpo recubre la placa ELISA en ELISA es la adsorción física, el marcador

5 HRP usado es la proteína macromolecular, y generalmente toma una relación molar 1: 1 cuando marca el anticuerpo; sin embargo, el proceso por el que el anticuerpo recubre las microesferas magnéticas en CLIA y la proporción con que el anticuerpo está marcado con compuestos de molécula pequeña ABEI tienen una diferencia relativamente grande con respecto al ELISA, por lo que el impacto en la naturaleza del anticuerpo propiamente dicho no es el mismo. Además, la función de señal de amplificación de CLIA supera largamente el ELISA, y los requisitos sobre la sensibilidad del anticuerpo son mayores. Por lo tanto, solo una pequeña fracción de los pares de anticuerpos que se pueden aplicar a ELISA es adecuada para CLIA.

10 Al comparar el Ejemplo 3 y el Ejemplo comparativo, descubrimos que el primero solo requería el uso de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular cuando se realizaba el cribado de emparejamiento, mientras que el último requería los anticuerpos preparados; el primero no necesitaba la purificación y el marcado de anticuerpos en el proceso de selección, mientras que el segundo debe usar los anticuerpos purificados y marcados con HRP; de manera similar para los 20 anticuerpos obtenidos, en el primero todos se pudieron emparejar con los anticuerpos de alta sensibilidad existentes, mientras que el último solo obtuvo seis pares de anticuerpos de los cuales solo uno se pudo emparejar con los anticuerpos de alta sensibilidad existentes; el primero obtuvo cinco pares de anticuerpos que pueden usarse en el método sándwich CLIA, mientras que el segundo obtuvo solo un par con el efecto de emparejamiento no tan bueno como el primero.

15 A partir de la descripción anterior, se puede ver que los ejemplos de la presente solicitud descritos anteriormente lograron los siguientes efectos técnicos:

20 1) La detección de emparejamiento se puede realizar directamente con el sobrenadante de cultivo celular, lo que expande en gran medida la fuente de anticuerpos a detectar, y no necesita marcado y purificación en el proceso de selección;

2) Cuando se obtienen demasiados anticuerpos en el cribado preliminar se establece un sistema de evaluación efectivo para un examen posterior, lo que ahorra mano de obra y aumenta en gran medida la tasa de éxito.

25

30

35

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para preparar un par de anticuerpos, que comprende: usar un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente como anticuerpo de captura y usar un anticuerpo anti-fragmento cristalizable como anticuerpo marcado para cribar directamente un anticuerpo objetivo que pueda emparejarse con dicho anticuerpo existente del sobrenadante de cultivo celular; el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es Fab' o F(ab)₂, y dicho anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-Fc.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es F(ab')₂; que comprende además: optimizar los anticuerpos cribados según el contenido total de anticuerpos en dicho sobrenadante de cultivo celular, o la fuerza de unión de un anticuerpo a cribar en dicho sobrenadante de cultivo celular a un antígeno objetivo, y dicho sobrenadante de cultivo celular proviene de células de hibridoma.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo marcado se marca con un marcador rastreador, que marca directa o indirectamente dicho anticuerpo marcado.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho marcador rastreador se selecciona de al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados y un marcado radiactivo.
- 20 5. Método según la reivindicación 2, en el que dicho paso de optimización comprende:
- a) detectar los anticuerpos cribados que pueden emparejarse con el anticuerpo de captura en el sobrenadante de cultivo celular mediante el método sándwich, y registrar la señal resultante como OD₁;
- 20 b) detectar contenido total de anticuerpos en dicho sobrenadante de cultivo celular y registrar la señal resultante como OD₂;
- c) detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en dicho sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo, y registrar la señal resultante como OD₃; y
- d) evaluar y optimizar el anticuerpo cribado en dicho paso a) basado en la proporción OD₁/OD₂ u OD₁/OD₃.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho paso d) comprende:
- 1) si el cultivo celular es un cultivo celular de cepa celular individual, entonces el anticuerpo con mayor OD₁/OD₂ se empareja mejor con dicho anticuerpo existente;
- 2) si el cultivo celular es un cultivo celular de múltiples cepas celulares, entonces el cultivo celular con mayor OD₁/OD₃ se selecciona para separarse en células individuales para cultivo continuo a fin de obtener nuevos cultivos celulares, y los nuevos cultivos celulares se optimizan adicionalmente enseguida a dicho paso 1).
- 30 7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho paso d) comprende específicamente:
- dividir dichos cultivos celulares en dos grupos según pocillos de colonias individuales y pocillos de colonias múltiples;
- 35 clasificar el grupo de los pocillos de colonias individuales según OD₁/OD₂ de alto a bajo, y seleccionar las primeras N cepas de células, donde N es 1-20;
- clasificar el grupo de los pocillos de colonias múltiples según OD₁/OD₃ de alto a bajo, y seleccionar los primeros M pocillos de células para la subclonación respectivamente, y luego detectar las células subclonadas según los métodos de dicho paso a) y dicho paso b) y seleccionar N cepas de células con mayor OD₁/OD₂, donde dicho M es 1-40.
- 40 8. Método según la reivindicación 5, en el que dicho paso b) comprende específicamente: detectar el contenido total de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo celular usando un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo se selecciona de la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y dicha proteína de unión a inmunoglobulina es una proteína A de Estafilococo y/o una

proteína G de *Estreptococo*.

10. Método según la reivindicación 5, en el que dicho paso c) comprende específicamente: recubrir el antígeno objetivo en una fase sólida y detectar la fuerza de unión del anticuerpo a cribar en dicho sobrenadante de cultivo celular al antígeno objetivo mediante un segundo anticuerpo.

- 5 11. Método según la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea, un anticuerpo anti-calcitonina, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata, un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, que comprende además la expansión del cultivo celular que contiene el anticuerpo cribado y la preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.

- 25 13. Uso de un kit en la preparación de un par de anticuerpos, en el que el kit comprende:

un anticuerpo de captura, que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo existente inmovilizado en un medio en fase sólida, el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es Fab' o F(ab)₂ y

un anticuerpo marcado, que es un anticuerpo anti-fragmento cristalizabile; y

- 30 un antígeno objetivo que se une directa o indirectamente a un medio en fase sólida; y

un anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo o una proteína de unión a inmunoglobulina.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo existente es F (ab')₂.

- 35 15. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo marcado se marca con un marcador rastreador, que marca directa o indirectamente dicho anticuerpo marcado.

16. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho marcador rastreador se selecciona de al menos uno de un marcado enzimático, una tinta fluorescente, una tinta quimioluminiscente, isoluminol y sus derivados y un marcado radiactivo.

- 40 17. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo que se une específicamente a una región conservada de anticuerpo se selecciona de la mezcla de dos o más cepas de IgM anti-ratón de cabra, IgA anti-ratón de cabra, IgD anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de cabra, IgG2a anti-ratón de cabra, IgG2b anti-ratón de cabra, IgG3 anti-ratón de cabra, IgM anti-ratón de conejo, IgA anti-ratón de conejo, IgD anti-ratón de conejo, IgG1 anti-ratón de conejo, IgG2a anti-ratón de conejo, IgG2b anti-ratón de conejo e IgG3 anti-ratón de conejo, y dicha proteína de unión a inmunoglobulina es una proteína A de *Estafilococo* y/o una proteína G de *Estreptococo*.

18. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha fase sólida es una placa ELISA, microesferas magnéticas u oro coloidal.

- 50 19. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo existente es uno cualquiera del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gastrina-17, un anticuerpo anti-proteína de unión a folato, un anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea, un anticuerpo anti-tiroglobulina, un anticuerpo anti-insulina, un anticuerpo anti-ferritina, un anticuerpo anti-alfa-fetoproteína, un anticuerpo anti-carcinoembrionario, un anticuerpo anti-antígeno

- prostático específico, un anticuerpo anti-hormona luteinizante, un anticuerpo anti-prolactina, un anticuerpo anti-gonadotropina coriónica humana, un anticuerpo anti-enolasa neuronal específica, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 125, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 153, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 199, un anticuerpo anti-fragmento diecinueve de citoqueratina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 724, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 242, un anticuerpo anti-hormona de crecimiento, un anticuerpo anti-mioglobina, un anticuerpo anti-antígeno de carbohidrato 50, un anticuerpo anti-proteína C reactiva, un anticuerpo anti-corticotropina, un anticuerpo anti-isoenzima creatina quinasa, un anticuerpo anti-proteína Sangtec 100, un anticuerpo anti-laminina, un anticuerpo anti-colágeno tipo IV, un anticuerpo anti-proteína precursor N-terminal del péptido natural del cerebro, un anticuerpo anti-troponina, un anticuerpo anti-hormona paratiroidea, un anticuerpo anti-calcitonina, un anticuerpo anti-procalcitonina, un anticuerpo anti-fosfatasa ácida de la próstata , un anticuerpo anti-osteocalcina, un anticuerpo anti-proteína A asociada al embarazo, un anticuerpo anti-pepsinógeno I, un anticuerpo anti-pepsinógeno II, un anticuerpo anti-factor de crecimiento similar a insulina o un anticuerpo anti-D-dímero.
- 5
- 10
- 15
20. Uso según la reivindicación 13 en el que dicho kit comprende además: los reactivos usados en el cultivo de expansión de cultivos celulares y en la preparación y purificación a gran escala del anticuerpo objetivo.
21. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho kit se usa en un analizador de inmunoensayo semiautomático o completamente automático.

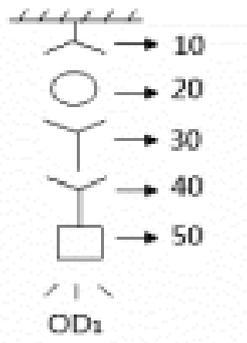


FIGURA 1

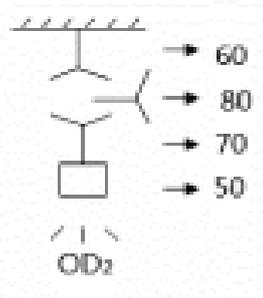


FIGURA 2

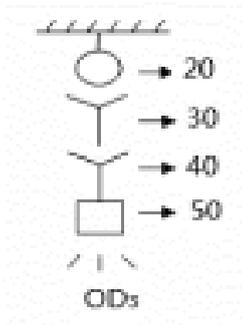


FIGURA 3