(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓNEN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
12 de noviembre de 2009 (12.11.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/135976 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070130

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de abril de 2009 (29.04.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200801324 8 de mayo de 2008 (08.05.2008) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **SILVA GONZÁLEZ, Augusto** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biologicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **DEL VALLE TORRES, Ignacio** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biologicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **GARCÍA BENZAQUEN, Leyre** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biologicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

WO 2009/135976 A1

(54) **Title**: METHOD FOR GENERATING MONOCLONAL ANTIBODIES THAT RECOGNIZE PROGENITOR CELLS

(54) **Título**: MÉTODO PARA GENERAR ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN CÉLULAS PROGENITORAS

(57) **Abstract**: Method for generating monoclonal antibodies that recognize progenitor cells. Said method comprises immunization of an Armenian hamster with neurospheres obtained from olfactory bulb cells from a 13.5-day mouse embryo and subsequent selection of the antibodies by means of neurosphere flow cytometry in the presence of propidium iodide. The antibodies thus obtained may be of use in the enrichment of cell cultures in progenitor cells, primarily neural progenitor cells.

(57) **Resumen**: Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen células progenitoras. Este procedimiento comprende la inmunización de un hámster armenio con neuroesferas obtenidas a partir de células de bulbo olfatorio de un embrión de ratón de 13,5 días y la posterior selección de los anticuerpos mediante citometría de flujo de neuroesferas en presencia de ioduro de propidio. Los anticuerpos así obtenidos pueden ser útiles en el enriquecimiento de cultivos celulares en células progenitoras, sobre todo células progenitoras neurales.

Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen células progenitoras

La presente invención se refiere al empleo de los anticuerpos monoclonales, denominados NILO1 y NILO2, que se unen a marcadores de superficie celular, con el fin de identificar, aislar y enriquecer poblaciones en células progenitoras, incluyendo células progenitoras del sistema nervioso central. También se refiere al método específico para obtener los anticuerpos, a una composición farmacéutica que contenga dichos anticuerpos y a sus usos, entre los que se incluye un método para identificar el efecto de una molécula o fármaco sobre poblaciones de células progenitoras.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Con pocas excepciones, las poblaciones neuronales del sistema nervioso central (SNC) habían sido consideradas como esencialmente posmitóticas y diferenciadas, sin capacidad de ser reemplazadas tras su muerte. La confirmación de procesos de neurogénesis activa, principalmente en dos áreas del SNC adulto de todos los mamíferos (Altman and Das, 1965. *J Comp Neurol* 124: 319-35; Alvarez-Buylla et al., 2000. *Prog Brain Res* 127: 1-11; Bedard and Parent, 2004. *Brain Res Dev Brain Res* 151: 159-68; Bonnert et al., 2006. *Eur J Neurosci*; Lennington et al., 2003. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 99), sugiere un potencial del cerebro para regenerarse, incluyendo el cerebro humano. Esto ofrece un futuro prometedor para las terapias de reemplazo celular y, por lo tanto, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para las cuales todavía no se dispone de un enfoque terapéutico efectivo.

Las células madre neurales constituyen el origen de todas las células cerebrales, las neuronas y la glia. Las células de glia, inicialmente consideradas como células de soporte, incluyen a los astrocitos, células

con forma estrellada e involucradas en diferentes funciones, y los oligodendrocitos, que rodean con mielina los axones de las neuronas para protegerlos. El número de células madre neurales es muy escaso en un cerebro adulto, aunque la neurogénesis se mantiene a lo largo de la vida en ratones y probablemente en humanos.

Las células madres neurales se concentran principalmente en unos nichos determinados del tejido nervioso central que son particularmente, la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral (Doetsch et al., 1999. *Cell* 97: 703-16) y la zona subgranular del hipocampo, debajo del giro dentado. La zona subventricular telencefálica (SVZ) es la fuente principal de células madre neuronales en ratones adultos, generando las neuronas del bulbo olfatorio (OB) (Álvarez-Buylla et al., 2000. *Prog Brain Res* 127: 1-11; Bedard et al., 2002. *Eur J Neurosci* 16: 1917-24; Doetsch et al., 2002. *Neuron* 36: 1021-34; Dutton and Bartlett, 2000. *Dev Neurosci* 22: 96-105; Pencea et al., 2001. *Exp Neurol* 172: 1-16). La SVZ consiste en una lámina delgada de células proliferando activamente en la edad adulta, cubriendo las paredes de los ventrículos laterales. (Doetsch et al., 1999. *Cell* 97: 703-16). Algunas de estas células progenitoras están concentradas en el cuerpo anterior del ventrículo, dando lugar a la vía migratoria rostral (RMS= *rostral migratory stream*).

Eventualmente las células madre neurales pueden también derivar del builbo olfatorio como resultado de la migración de las células subependimales por la vía migratoria rostral (Alvarez-Buylla y Lim, 2004. *Neuron* 41: 683-6). Estás áreas se definen como neurogénicas dada la posibililidad de obtener *in vitro* células capaces de mantener la autorenovación creciendo o en monoláminas sobre substrato recubierto de tejido o como agregados de células conocidos como neuroesferas. Las células madre neurales pueden proliferar y mantener la capacidad de autorenovación si crecen en el medio apropiado suplementado con EFG y

FGF básico. La retirada de estos factores del medio provoca la diferenciación en los principales tipos neurales, neuronas y células de la glia (astrocitos y oligodendrocitos).

De estas zonas proliferativas, se han aislado las células pluripotentes y se han clonado y expandido en cultivo. Bajo condiciones *in vitro*, o luego de ser transplantadas, estas células tienen la capacidad de generar los tres principales tipos celulares del sistema nervioso central y, por ello, son clasificadas como células pluripotentes neurales.

La sustitución funcional de poblaciones neuronales específicas mediante transplante de tejido neural representa una estrategia terapéutica atractiva para tratar enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, actualmente, las células madre neurales se obtienen a partir de tejido cerebral, mediante biopsia de tejido o necropsia, lo que plantea problemas éticos y de compatibilidad inmunológica. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar una fuente de células madre neurales que supere los inconvenientes mencionados.

En este sentido, se conocen anticuerpos monoclonales que identifican células madres neurales utilizando antígenos presentes en el interior de la célula (antígenos intracitoplasmicos), que tienen como inconveniente que no pueden ser utilizados para seleccionar poblaciones celulares viables, ya que requieren permeabilizar la membrana citoplásmica, con la consiguiente muerte celular, para que el anticuerpo pueda unirse a su antígeno que está en el interior de la célula. Existen muchos anticuerpos monoclonales intracitoplasmicos que caracterizan células precursoras neurales, como nestina, Sox2, Vimentina, o GFAP (para precursores muy inmaduros) y doblecortina, PSA-NCAM, Ki67, y tubulina β-III (para precursores proliferativos, y neuroblastos), pero hasta la fecha solo se han caracterizado unos pocos anticuerpos frente a los antígenos de superficie

de las células progenitoras neurales.

Se ha propuesto la perdida de tejido neural como la causa de de algunas patologías neuro-degenerativas que conllevan a una perdida progresiva de respuesta cerebral y la muerte del individuo. Hoy no existen tratamientos curativos de estas enfermedades y solo determinados tratamientos paliativos logran mejoras temporales de la enfermedad. Una de las razones de esta situación de cura temporal, es por la imposibilidad de suministrarles a estos enfermos mediante el transplante nuevas células madre neurales, una terapia celular que les permitiría regenerar, al menos en parte, el tejido dañado y mejorar su situación, probablemente de forma definitiva.

Pero hasta hoy ha sido prácticamente imposible obtener herramientas que permitan la purificación de células madre para su posterior enriquecimiento, selección y estudio o uso como agentes terapéuticos, lo que indica claramente la necesidad de encontrar nuevos marcadores de superficie contra las células neurales.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Existe, por tanto, la necesidad de encontrar una herramienta que permita la detección de células progenitoras para el enriquecimiento de poblaciones de células madre y precursores tempranos, lo que permitiría su estudio y uso como agentes terapéuticos.

En este sentido y de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana de células progenitoras que comprende:

a. Generación de neuroesferas que contengan células madre neurales (CMN) a partir del bulbo olfativo de un embrión de ratón de 13,5 días de edad.
b. Inmunización de un hámster armenio macho de 4 meses de edad con células viables de neuroesferas
c. Obtención de los linfocitos mediante la extracción del bazo de dicho animal
d. Fusión de los linfocitos con células de mieloma no-productor de ratón, dando lugar a células híbridas o hibridomas
e. Determinación y/o selección de los anticuerpos producidos por los hibridomas mediante citometría de flujo de células de neuroesferas, donde las células muertas se excluyen del análisis, en presencia de ioduro de propidio.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona unos anticuerpos monoclonales, obtenidos por el procedimiento anterior, que comprenden:

a) el anticuerpo monoclonal, denominado NILO1 (clon 1 B6.2.13), producido por el hibridoma depositado el 12 de marzo de 2008 con el número de acceso DSM No. ACC2887 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania.

b) el anticuerpo monoclonal, denominado NILO2 (clone 2 B7.10), producido por el hibridoma depositado el 4 de febrero de 2008 bajo el número de acceso DSM No. ACC2881 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Braunschweig, Alemania.

Un tercer aspecto de la presente invención lo constituyen los fragmento/s

activo/s de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la reivindicación anterior.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una construcción genética de ARN ó ADN capaz de transcribirse a un anticuerpo/s o fragmento/s de anticuerpo/s de la invención, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Dicha construcción genética, dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia o secuencias del anticuerpo o anticuerpos (NILO1 y/o NILO2) o fragmento o fragmentos del mismo o de los mismos, de la invención, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de un anticuerpo de la invención o del fragmento de anticuerpo de la invención para su transcripción, b) secuencia de nucleótidos, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para su transcripción y regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 1989) y forman parte de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención lo constituyen los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales NILO 1 y NILO 2,

depositados bajo el número de acceso DSM No. ACC2887 y DSM No. ACC2881 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Braunschweig, Alemania.

Otro aspecto de la presente invención describe un método para producir una población altamente enriquecida en células madre ó progenitoras que comprende:

a) Poner en contacto una población de células con un reactivo que reconoce un epítopo o determinante antigénico en un marcador de superficie celular reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o el anticuerpo monoclonal NILO2; y

b) Seleccionar las células en las que existe un contacto entre el reactivo y el epítopo o determinante antigénico.

En una realización preferida de la presente invención, las células madre, son células madre del sistema nervioso central humano que puede iniciar neuroesferas (NS-IC).

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la población conteniendo células neurales o células derivadas neurales se obtiene de un cultivo de neuroesferas.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención el reactivo se selecciona de una lista que comprende:

a) un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un epítopo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1,

b) un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un

epítopo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 2,

c) un anticuerpo NILO 1 o fragmentos activos del mismo.

d) un anticuerpo NILO 2 o fragmentos activos del mismo.

e) un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO1,

f) un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO2,

g) un fluorocromo conjugado,

h) un conjugado con partículas magnéticas.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención el reactivo contiene el anticuerpo monoclonal NILO1 y/o NILO 2, acoplado o acoplados a marcadores como enzimas, cromóforos, materiales quimioluminiscentes, radionucleótidos o nanopartículas.

En una realización aún más preferida de la presente invención, la selección de las células progenitoras se realiza mediante técnicas de citometría de flujo, citometría de flujo FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), o de microscopía, o utilizando técnicas de inmunocitoquímica (células) o inmunohistoquímica (tejido), o por selección magnética, o por cualquier otro método de selección positiva.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una población enriquecida de células madre o células progenitoras neurales. Dicha población enriquecida se ha obtenido según el método descrito previamente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la población enriquecida en células madre o células progenitoras se usa como medicamento.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la población enriquecida en células madre o células progenitoras se usa en el tratamiento de patologías degenerativas o que cursen con procesos de destrucción tisular. Entre estas enfermedades se encuentran, pero sin limitarse a, el Alzheimer, el Parkinson, la diabetes, la necrosis cardiovascular o la depleción hematopoyética.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método de *screening* o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

a) seleccionar de una población que contiene células neurales o células derivadas neurales que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o al anticuerpo monoclonal NILO 2, y de este modo producir una población enriquecida para células humanas iniciadoras de neuroesferas (NS-IC) si se compara con la población de células neurales o derivadas neurales,

b) inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida,

c) administrar una composición con potencial farmaceútico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y

d) comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

En una realización preferida de la presente invención, el mamífero no humano es un roedor.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método de screening o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

a) seleccionar de una población que contiene células neurales o células derivadas neurales que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1, y enriquecer más aún dicha población por selección adicional de las células que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 2, y de este modo producir una población enriquecida para células humanas iniciadoras de neuroesferas (NS-IC) si se compara con la población de células neurales o derivadas neurales,

b) inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida para CNS-SC humanas que pueden iniciar neuroesferas (NS-IC)

c) administrar una composición con potencial farmaceútico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y

d) comparar el efecto de dicha administración

En una realización preferida de este aspecto de la invención se describe un método como el anterior, en el que el mamífero no humano es un roedor.

Definiciones

El término "anticuerpo" tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un marcador de superficie o un epítopo. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')2 que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina.

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se emplea en esta memoria, alude a una población

de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular de las células progenitoras. Una composición de anticuerpo monoclonal, por tanto, manifiesta una única afinidad de unión para la célula progenitora con la que inmunorreacciona. Los anticuerpos convencionales, o "anticuerpos policlonales" incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes distintos (epítopos), mientras que cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único epítopo en el antígeno.

El término "epítopo" en esta memoria se refiere a la parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, células B, o células T. Aunque usualmente se piensa que los epítopos se derivan de proteínas no propias, las secuencias derivadas del hospedador pueden ser reconocidas y también clasificadas como epítopos.

Usando tecnología de ADN recombinante, es posible construir un anticuerpo monoclonal uniendo la región variable o de reconocimiento antigénico a un armazón de un anticuerpo humano. Así, el anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la célula progenitora y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

Un "anticuerpo recombinante" es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo, o produce el mismo como resultado de la recombinación homóloga.

"Transformación" y "transfección" se utilizan de manera intercambiable para referirse al procedimiento de introducción del ácido nucleico en una célula. Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora o puede existir como un elemento extracromosomal. La "célula hospedadora" incluye una célula en un cultivo *in vitro* así como una célula en un animal hospedador. En la patente US 5,534,615 se describen, por ejemplo, algunos de estos procedimientos para la producción recombinante de polipéptidos.

Se dice que una célula ha sido "genéticamente alterada", "transfectada" o "genéticamente transformada" cuando un polinucleótido ha sido transferido a una célula por cualquier método disponible mediante manipulación artificial, o cuando la célula es la progenie de la originalmente alterada que tiene inherentemente el polinucleótido transferido. El polinucleótido puede comprender, a menudo, una secuencia que puede transcribirse y que codifica una proteína de interés, la cual permite a la célula expresar dicha proteína. La alteración genética se dice que es "heredable" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.

Los anticuerpos también pueden ser "quiméricos", inmunoglobulinas en las que una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de un especie determinada o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s) a, o homóloga(s) a, las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada (patente US 4,816,567).

El término "región hipervariable" cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que

son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable". Los residuos de sostén (en inglés "framework") o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, tal y como se han definido en el presente documento.

En la mayoría de casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de las regiones hipervariables del receptor se han sustituido por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

En algunos casos, los residuos de sostén (FR) de la región Fv de inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más la función del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o prácticamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, por lo menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), en general de una inmunoglobulina humana. Distintos procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados son conocidos en el estado de la técnica.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o

variable, del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F (ab')2 y Fv; homodímeros bivalentes (en inglés "diabodies"); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos proceden de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora de manera directa mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperardirectamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')2. En otra realización, el F(ab')2 se forma utilizando la cremallera de leucinas GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')2. De acuerdo con otra aproximación, se pueden aislar directamente los fragmentos de F(ab')2 del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los practicantes expertos. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Para una revisión, véase WO/1993/016185.

El "Fv de cadena sencilla" (scFv) o los "fragmentos de anticuerpos" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende, además, un engarce polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

El término "homodímeros bivalentes" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo estos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a

un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. Utilizando un engarce que sea demasiado corto para dejar que se emparejen los dos dominios en la misma cadena, se fuerzan los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a anticuerpos que comprenden un par de segmentos tándem Fd (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los “anticuerpos multiespecíficos” tienen especificidades de unión para, por lo menos, dos epítopos diferentes, en donde los epítopos son, normalmente, de antígenos diferentes. Mientras que tales moléculas normalmente se unirán solo a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales tales como los anticuerpos triespecíficos, se engloban dentro de la expresión cuando es utilizada en el presente documento. En el estado de la técnica se conocen procedimientos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. En la presente invención los fragmentos de anticuerpo son capaces de unirse específicamente a un epítopo de una célula progenitora.

El término “célula madre" se refiere a una célula indiferenciada relativamente quiescente que es capaz de proliferar y dar lugar a más células madre, teniendo asimismo la habilidad de generar un gran número de células progenitoras que, a su vez, pueden dar lugar a células diferenciadas, o células hija diferenciadas o diferenciables. Pueden automantenerse, lo que significa que con cada división celular, una célula hija será también una célula madre.

El término “célula madre neural" (CMN) se refiere a las células madre multipotenciales capaces de producir una progenie que sea capaz de

diferenciar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

El término “célula progenitora" se refiere a una célula no diferenciada derivada de una célula madre La célula progenitora puede autorenovarse pero tiene una capacidad proliferativa limitada (a diferencia de una célula madre, la capacidad de proliferación está limitada y, por lo tanto, no exhibe un automantenimiento). Está comprometida a una vía particular de diferenciación y eventualmente, en condiciones apropiadas, a diferenciar a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos.

El término “células precursoras" se refiere a las células vivas modificadas o manipuladas mediante los métodos del invento inmediato que se derivan de células madre, *in vivo* o *in vitro*, e incluyen tanto células progenitoras como células madre, siendo por tanto autorrenovables y multipotentes. *In vitro*, las células precursoras derivadas de las células madre neurales crecen típicamente en la forma de neuroesferas, pero pueden exhibir diferentes patrones de crecimiento dependiendo de las condiciones de cultivo.

El término “neuroesfera" se refiere a un agrupamiento de células derivadas de células madre neurales y cultivadas *in vitro*. Al menos algunas de las células son del fenotipo nestina (+) (que reaccionan con la nestina, marcador intracitoplasmico de células madre neurales). El agrupamiento está compuesto de células madre y/o células progenitoras, y puede o no incluir células diferenciadas.

La fuente preferente de tejido neuronal se obtiene a partir de mamíferos, preferentemente de roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y de primates, siendo el más preferente a partir de humanos (excluyendo tejidos embrionarios humanos). En las patentes US 5,750,376 y 5,851,832 se describe un método para el aislamiento y proliferación de células madre

neuronales del SNC autorenovables y multipotenciales a partir de tejido neuronal de humano adulto, de mono Rhesus adulto, de embrión de ratón, y a partir de tejido cerebral de ratón juvenil y adulto. El método incluye el establecimiento de células madre neuronales en el cultivo a partir de células madre neuronales del SNC, así como la diferenciación de la progenie de la célula madre neuronal del SNC.

El término" ventrículo" se refiere a cualquier cavidad o conducto dentro del sistema nervioso central a través del que fluye el fluido cerebroespinal. Así, el término no sólo abarca los ventrículos laterales, tercero y cuarto, sino también abarca el canal central y el acueducto cerebral.

El término"tejido ventricular" se refiere a los tejidos que revisten los ventrículos del SNC e incluyen el subependima que comprende una colección de células no diferenciadas incluyendo las células madre del SNC y las células progenitoras.

El término"población proliferante de modo constitutivo" se refiere a la población de células que se dividen localizadas dentro del subependima de los ventrículos laterales del cerebro anterior de mammíferos adultos [como se perfiló por Smart; J. Comp. Neurol. 116:325, (1961)], y comprende aproximadamente el 33% de las células en algunas regiones del subependima [Morshead y van der Kooy, J. Neurosci. 12:249, (1992)].

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama describiendo el origen de los hibridomas NILO.

A partir del bulbo olfativo de un embrión de 13,5 días se generan neuroesferas que en pase 5-6 son usadas como antígenos para inmunizar un hámster armenio (*Cricetulus migratorius)* adulto con tres inyecciones de 5 millones de células, durante tres meses. Tres días después de la última inmunización las células del bazo se fusionan con el mieloma no productor de Balb/c P3-X63.Ag8.653. Los clones seleccionados en HAT, se crecen y se analizan mediante citometría de flujo.

Figura 2. Diagrama del método de selección de los anticuerpos monoclonales.

a) Se seleccionan por citometría de flujo los anticuerpos monoclonales que marquen con cierta intensidad células derivadas de neuroesferas del bulbo olfativo de ratones de 13,5 días y neuroesferas derivadas de la SVZ de ratones adultos 6 semanas. La citometría se realizó en un Coulter XL; se pasaron 10,000 eventos seleccionándose aquellos con morfología celular y que no eran teñidos con ioduro de propidio, para excluir a las células muertas. b) Marcaje de células de tejido neural derivado de la SVZ de ratones de seis semanas, para NILO1 o NILO2, y tras sus diferentes pasos en cultivo celular como neuroesferas.

Figura 3. Marcaje de células de neuroesferas con NILO1 y NILO2 mediante inmunocitoquimica.

a) Las neuroesferas fueron marcadas simultáneamente con nestina y con un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón-FITC y con NILO1 utilizando un secundario anti-hámster marcado con Cy5. b) igual que a) pero marcando con anti-GFAP, NILO1 y DAPI (nucleos). c) d) y e) neuroesferas en Matrigel® marcados con NILO2.

Figura 4. Doble expresión de NILO y anticuerpos que definen poblaciones neurales en células de neuroesferas sobre Matrigel®.

a) y c) NILO1 con GFAP a diferentes aumentos; b) y d) NILO2 con GFAP a diferentes aumentos; e) NILO1 y nestina; f) NILO1 y Ki67.

Figura 5. Marcaje de cortes de cerebro con NILO1 detectando células progenitoras neurales en regiones neurogénicas del SVZ.

Cortes de criostato de tejido fijado con paraformaldehido y teñido con NILO1 (verde-FITC) y doblecortina (DCX), GFAP, Vimentina, Tubulina βIII (Tuj1), Ki-67 y PSA-NCAM. Los anticuerpos monoclonales están indicados en la Tabla 1.

Figura 6. Marcaje de cortes de cerebro con NILO2 detectando células progenitoras neurales en regiones neurogénicas del SVZ.

Cortes de criostato de tejido fijado con paraformaldehido y teñido con NILO2 (verde-FITC) y doblecortina (DCX), GFAP, Vimentina, Tubulina βIII (Tuj1), Ki-67 y PSA-NCAM. Los anticuerpos monoclonales están indicados en la Tabla 1.

Figura 7. Proteína de superficie inmunoprecipitada por NILO2 en células derivadas de neuroesferas y en la línea células C2C12.

Las células son incubadas con NILO2 y posteriormente lisadas con tampón de lisis en presencia 5% de Brig58 (Sigma). Los estractos purificados se revelan con diferentes métodos.

Figura 8. Efecto de NILO1 y NILO2 sobre la proliferación de las células de neuroesferas.

Las células se incuban en presencia de las concentraciones de anticuerpo indicado durante 24, 48 y 72 horas y la proliferación medida utilizando el compuesto MTS tetrazolium para medir la proliferación.

Figura 9. Efecto de NILO1 y NILO2 sobre la diferenciación de las células de neuroesferas.

Las células se incuban en presencia de medio de neuroesferas en ausencia de FGF2 y EGF y en presencia de 0,5% de FCS, lo que provoca una rápida diferenciación de las células precursoras hacia las células diferenciadas. En presencia de las concentraciones de anticuerpo indicado durante 2 días y 4 días medimos la capacidad de las células de proliferar, utilizando el MTS tetrazolium para medir la proliferación y su capacidad de diferenciarse o mantener su estructura de neuroesfera.

Figura 10. NILO1 es capaz de identificar células precursoras mesenquimales presentes en médula ósea.

a) La células de médula ósea se seleccionan mediante citometría de flujo (sorting) utilizando NILO1, o b) se seleccionan por su capacidad de adherencia y de obtener células mesenquimales. c) células precursoras mesenquimales en médula ósea o seleccionadas tras una semana en cultivo marcadas con NILO1. d) células de medula ósea o mesenquimales marcadas con Sca-1, Alpha6, beta1, NILO1 y NILO2, e) células NILO1 tras dos semanas en medio de neuroesferas y f) su diferenciación en células Tuj1+, o g) células NILO1 tras seis semanas en medio de diferenciación de adipocitos (teñidos con red oil) o h) sin teñir (gotas de grasa).

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO2.

EJEMPLO 1. Generación de los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO 2.

Presentamos un método de obtención de anticuerpos monoclonales frente a células madre neurales, que cuenta con el uso de neuroesferas derivadas de células embrionarias de 13,5 días, como fuente de estimulo antigénico y la utilización de hámster armenios de menos de tres meses de edad, como receptor de las inmunizaciones, a través de una pauta especifica. La obtención del bazo y su fusión con células de mieloma de ratón, permite, tras la selección en medios selectivos específicos de hibridomas inter-especie que secretan anticuerpos monoclonales de origen hámster y con especificidad contra células madre neurales, tanto de origen embrionario como de células madre neurales de animales adultos.

Antígeno utilizado para la inmunización

Se emplearon células madre neurales (CMN) derivadas de neuroesferas. Las células que crecen como neuroesferas pueden disgregarse y clonarse en cultivos siendo capaces de formar nuevas neuroesferas. Las células que forman parte de las neuroesferas se consideran células progenitoras neurales al ser capaces de diferenciarse en cultivos "*in vitro*" en los diferentes tipos celulares del cerebro como son neuronas y glía (astrocitos y oligodendrocitos). Además, estas células tienen marcadores intracelulares definidos, como "nestina", y pueden ser diferenciadas hacia células de cualquiera de los linajes neurales como neuronas, oligodendrocitos o astrocitos.

Estas CMN pueden mantenerse en cultivo a través de pases de diluciones celulares, aunque las condiciones y peculiaridades de las células en proliferación pueden cambiar en función del número de pases que se mantengan en cultivo. Este protocolo, para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a estas CMN utiliza células en pase de 3 a 5, siendo el pase 0, el momento de obtener estas células del tejido del ratón.

Existen diferentes regiones cerebrales en el ratón adulto que pueden ser utilizadas para obtener CMN. Las zonas neurogénicas más importantes son la región subventricular (SVZ) y la región granulosa del giro dentado de la hipófisis. Sin embargo, la eficiencia de obtención de células CMN en el ratón adulto es baja, y dado que se requieren un mínimo numero de células para llevar a cabo las repetidas inmunizaciones, nuestro protocolo obtiene las CMN de tejido embrionario de ratones de 13,5 días, concretamente del bulbo olfatorio. De este tejido es fácil obtener cantidades importantes de CMN, que pueden ser utilizadas para inmunizar.

Animales utilizados para la inmunización.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a células progenitoras neurales de ratón, se han utilizado hámster armenios, machos, de 4 meses de edad. Los animales son mantenidos en el animalario en condiciones normales de temperatura y humedad, al igual que otros ratones, aunque en una sala independiente y en condiciones de tranquilidad. Aunque los hámsteres armenios habían sido ya usados para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a otros antígenos de ratón, nunca hasta la fecha han sido utilizados para generar anticuerpos frente a componentes neurales. Es importante que se usen hámster armenios, no sirviendo de igual manera otras subespecies de hámster.

Los animales fueron inmunizados con células viables de neuroesferas disgregadas, inyectadas en PBS a una concentración de $5x10^6$ células/ml. La vía de inmunización fue siempre intra-peritoneal, utilizando una aguja hipodérmica y en localizaciones alternas en cada inmunización ("*booster*"). La pauta de inmunización fue la siguiente: día 0, 30 días y 60 días. Tras la tercera re-inmunización con las células derivadas de neuroesferas, se esperan tres días y se sacrifica el animal, tras anestesia total, para extraer

el bazo, que será utilizado para la extracción de los linfocitos y su posterior fusión con las células del mieloma.

Fusión celular.

El protocolo de fusión es similar al previamente descrito por otros autores. Brevemente, los linfocitos derivados del bazo del hámster inmunizado con CMN, se lavan en medio y se resuspenden en medio DMEM sin suero. Las células del mieloma de ratón y las células que se van a fusionar se mezclan en un tubo de 50ml Falcon. Usamos 10^7 células de mieloma no-productor del ratón Balb.c denominado P3-X63.Ag8.653 y 10^6 células del bazo del hámster inmunizado por fusión. Las células se centrifugan juntas a 1500 r.p.m., durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante por aspiración para eliminarlo todo. El tubo solo con las células se pone en un baño a 37º C. Se añade 0.4 ml de polietilenglicol (PEG al 40% en agua) gota a gota sobre la suspensión celular, durante 1 minuto con agitación suave ocasional. Posteriormente se diluye lentamente gota a gota con 5 ml de medio DMEM sin suero y previamente atemperado a 37ºC, por un periodo no superior a 3 minutos. La suspensión se mezcla con suavidad, se completa con medio completo DMEM-10% FCS y se incuba a 37ºC de 30 a 45 min. Luego las células se distribuyen en 0,1ml/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se guardan en el incubador a 37º C, 5% CO2. Un día después de la fusión se añaden 0.1 ml/pocillo de medio DMEM-10% FCS conteniendo HA(2X). El medio se aspira y se cambia una vez a la semana. Los híbridos se detectan visualmente o bajo microscopio invertido a baja resolución. Tres semanas después de la fusión las colonias se traspasan a pocillos de placas de 24 pocillos con 2 ml de medio selectivo por pocillo.

Selección de anticuerpos con especificidad para las células madre neurales.

La selección se realiza mediante detección de células marcadas positivamente con nuestros anticuerpos en citometría de flujo frente a células CMN, derivadas; 1) neuroesferas de bulbo olfativo de embriones de 13,5 días, 2) neuroesferas de ratones adultos; 3) células del tumor de timo de ratón BW5147, 3) células de la medula ósea de ratones adultos.

El marcaje se realiza utilizando una dilución 1/2 del sobrenadante del cultivo celular. El anticuerpo secundario utilizado es un anti-hámster IgG (cocktail) (Becton Dickinson, Ltd.) marcado con distintas alternativas (fluorocromos FITC, PE o biotina).

Los sobrenadantes de la fusión que marcaban las células CMN de las neuroesferas y que eran negativas para el timoma BW5147, se expanden y se congelan. Se seleccionaron aproximadamente 80 anticuerpos de los 295 híbridos seleccionados. Entre los sobrenadantes seleccionados están los anticuerpos monoclonales denominados NILO1 y NILO2.

EJEMPLO 2. Identificación de células de neuroesferas con los anticuerpos monoclonales NILO.

NILO1 y NILO2 son inmunoglobulinas IgG de hámster que son producidas por hibridomas entre linfocitos B de hámster y el mieloma no productor P3-P3-X63.Ag8.653.653 derivado del ratón Balb/c. A pesar de ser una fusión inter-especies (hámster x ratón) la estabilidad del hibridoma es suficientemente alta para garantizar su selección y clonaje. Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas NILO1 y NILO2, pueden ser purificados mediante columnas de sefarosa unida a proteína G- o a proteína A, lo que garantiza su pureza y permite su marcaje directo con distintos colorantes (fluoresceína, ficoeritrina, etc). Actualmente se dispone de anticuerpos NILO marcados directamente con FITC y con PE.

Los anticuerpos NILO1 y NILO2, tienen una enorme selectividad por células madre neurales, como lo demuestran los estudios de inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, y funcionales presentados en esta memoria.

Por otro lado, se ha ensayado la unión de estos anticuerpos a partículas magnéticas, permitiendo una rápida purificación y en un solo paso de poblaciones progenitoras neurales de otras fuentes. Esto nos ha permitido enriquecer en un solo paso poblaciones de medula ósea que han sido utilizadas en experimentos de reconstitución celular. Esta situación tendrá una enorme repercusión para tratamientos de terapia celular en tratamientos específicos de patologías degenerativas (Alzehimer, Parkinson, etc.) o que cursen con procesos de destrucción tisular y hoy en día con una enorme repercusión (diabetes, necrosis cardiovascular, depleción hematopoyética, etc.).

Para demostrar la gran selectividad de los anticuerpos NILO se han realizado distintos tipos de diseños experimentales. El primer estudio consistió en demostrar el marcaje de las células de neuroesferas, detectadas mediante citometría de flujo. El marcaje de las células con estos anticuerpos se realizó en presencia de ioduro de propidio (10 µg/ml) para seleccionar exclusivamente las células negativas para este marcador de ADN, lo que garantizaba el marcaje de células vivas y que el marcaje no era intracitoplasmico (Figura 2). El perfil y el porcentaje de células marcadas por los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO2, difería entre ellos, lo que sugiere que cada anticuerpo esta identificando diferentes proteínas de superficie.

Usando técnicas de inmunocitoquímica se han analizado neuroesferas generadas de la región subventricular de cerebros de ratones adultos (Figura 3a), del bulbo olfativo de cerebros de embriones de ratones de

13,5 (Fig 3b), y del bulbo olfativo de ratones adultos (Figura 3c). Las neuroesferas están marcadas con doble tinción utilizando anticuerpo anti-nestina o anticuerpo anti-GFAP comerciales. El doble marcaje demuestra la especificidad de las células teñidas y su asociación con el linaje de célula madre neural. Además se realizó marcaje individual sobre células de neuroesferas separadas y adheridas al plástico de las placas de cultivo con Matrigel®, lo que permite su análisis mas detallado individual. En la Figura 4 se puede observar la expresión simultánea de GFAP, nestina y Ki-67 NILO1 o NILO2 sobre células en matrigel. GFAP marca células muy precursoras o células de glia. Claramente se puede observar que aunque la tinción es unicelular en ambos casos con GFAP, el marcaje de GFAP y NILO están localizados en áreas diferentes y no coincidentes dentro de la célula.

En la Figura 3 se puede comprobar la presencia de células NILO1 con la presencia de nestina, marcador intracitoplasmico de células madre neurales, aunque, NILO1 marca una subpoblación celular dentro de las células progenitoras neurales nestina+.

EJEMPLO 3. Marcadores NILO en la region SVZ del cerebro.

Los anticuerpos NILO son específicos de células madre neurales, tal como lo demuestra su presencia exclusiva en regiones neurogénicas de cerebros de ratones adultos. Principalmente se han detectado células positivas para NILO en la región SVZ de ratones adultos y en el giro dentado del hipocampo.

Para demostrar que las células NILO1 y NILO2 se corresponden con células progenitoras neurales realizamos estudio de inmunohistoquimica haciendo dobles marcajes con doblecortina (DCX), nestina (Nes), GFAP, vimentina, tubulina βIII, PSA-NCAM y Ki67, todos ellos marcadores

asociados a diferentes momentos del desarrollo de las células neurales a partir de las células precursoras neurales y tal como figura en la Tabla 1 adjunta. Los cortes de histoquimica están realizados mediante criostato en cortes semi-gruesos (30 micras), con el fin de analizar las secciones en detalle.

Los datos demuestran que NILO1 (Figura 5) y NILO2 (Figura 6) son marcadores selectivos de poblaciones progenitoras neurales identificando células progenitoras en ciclo y neuroblastos primitivos, ya que su marcaje coincide en células doblemente positivas para DCX, Ki67, Vimentina, Tubulina βIII, y en proximidad con el marcador GFAP, que aunque no es directamente coincidente, tal como observamos en histoquímica de las células en matrigel, co-localizan en áreas muy próximas.

Marcador	Referencia comercial	Características del marcador	Publicaciones
Nestina	MAB353 Chemicon	Filamento intermedio presente en progenitores neurales quiescentes y proliferativos y en células de neuroesferas. Negativo en neuroblastos	Niu S et al. Neuron 2005. 41
Glial fibrillary acid protein (GFAP)		Presente en glia radial y en precursores muy tempranos	Viale et al. Arch. A Pathol. Anat. 1991. 418

Vimentina	Ab7783 AbCam	Presente en progenitores tempranos quiescentes	Husse B y Isenberg G. BBRC 2005. 334
Polysialic acid-Neural Cell Adhesión (PSA-NCAM)	Chemicon MAB5324	Presente en neuroblastos 1 y 2 y en neuronas inmaduras. Negativo en precursores quiescentes tempranos y en neuronas maduras	Theodosis D et al. 1999. J. Neuroscience. 19 Rougon G et al. 1982. EMBO J. 1
Doblecortina (DCX) (C-18)	Sc-8066 SantaCruz	Neuroblastos tipo 1 y 2 y en neuronas proliferando	Reiner et al. Nature 1993. 364
Tubulina βIII (Tuj-1)	Ab14545 AbCam	Propio de neuroblastos 1 y 2, en neuronas inmaduras y maduras	Burgoyne RD, et al. EMBO J. 1988.
Ki67	(Sp6) RM-9106-S1 NeoMarkers	Marcador de proliferación, presente en precursores tempranos proliferativos y en células de neuroesferas	Namiki J y Tator J. Neuropathol Exp Neurol. 1999.

Tabla 1. Marcadores utilizados para detectar la presencia de NILO en células y regiones neurogénicas

EJEMPLO 4. Identificación de las proteínas de superficie reconocidas por los anticuerpos NILO.

Para identificar el antígeno reconocido por los anticuerpos NILO se han llevado a cabo inmunoprecipitaciones de estos anticuerpos sobre células progenitoras neurales para conocer el tamaño aproximado de los antígenos reconocidos por ellos. Se han utilizando células progenitoras

neurales marcadas en su superficie con biotina o alternativamente la línea C2C12 que es reconocida por los anticuerpos NILO2 y NILO2. Tras el marcaje de las células con biotina, se une el anticuerpo y posteriormente se lisa tal como se describe en Material y Métodos utilizando el detergente Brij1. Las proteínas inmunoprecipitadas con NILO2 tanto en células de neuroesferas como en la línea C2C12 presentan dos bandas mayoritarias de 140 y 170kD, mientras que NILO1 no puede ser utilizado en "western blot". Estos datos demuestran que cada anticuerpo monoclonal identifica a un diferente tipo de proteína de la superficie celular de las células progenitoras, independiente de la localización similar de estos anticuerpos por inmunohistoquimica. Una situación muy relevante es la que identifica el antígeno de superficie (receptor celular) que es identificado por NILO.

EJEMPLO 5. Efecto funcional de los anticuerpos NILO1 y NILO2 sobre la proliferación y diferenciación de las neuroesferas.

La distribución celular de NILO es homogénea en las células madre neurales. Las células madre neurales se mantienen en su condición de progenitoras siempre que sean mantenidas bajo estrictas condiciones de cultivo celular en presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el factor de crecimiento de epidérmico (EGF) y en ausencia de suero fetal bovino (FCS). En ausencia de estos factores, FGF y EGF y en presencia de FCS, las células detienen su proliferación y se diferencian en cualquiera de las células del linaje neural: neuronas, oligodendrocitos o astrocitos.

Se ha investigado el posible efecto funcional de los anticuerpos NILO sobre la proliferación de las células progenitoras neurales. Utilizando los anticuerpos NILO1 y NILO2 se ha demostrado que la interacción de los anticuerpos con las células madre neurales derivadas de neuroesferas de SVZ de adultos o de OB de E13,5, es capaz de bloquear los procesos de

proliferación (Figura 8) y diferenciación (Figura 9) de estas células hacia cualquiera de los tres tipos de células neurales (neuronas, oligodendrocitos o astrocitos).

Tanto NILO1 como NILO2 cuando se añaden en distintas concentraciones a neuroesferas en medios de cultivo que permiten su proliferación, detienen dicha proliferación celular . En presencia continua de los anticuerpos las células mueren a los 5-6 días. Todos estos datos sugieren que los anticuerpos NILO están reconociendo receptores involucrados en los procesos de auto-renovación celular o bien que esta bloqueando a los factores que mantienen la capacidad de autorenovación (tales como LIF u otros) (Figura 8).

Cuando las células de las neuroesferas se ponen en medio de diferenciación en ausencia de los factores FGF2 y EGF, con o sin 0,1% de suero fetal, y en presencia de distintas concentraciones de NILO1 purificado, hemos visto que el proceso de diferenciación se reduce considerablemente en comparación con el efecto observado en ausencia de anticuerpo. NILO2 provoca un efecto similar sobre la diferenciación de las neuroesferas aunque menos acusado que NILO1.

Esto datos demuestran que la interacción continua de NILO con estructuras de superficie de las células progenitoras neurales, genera cambios importantes en el comportamiento de estas células, lo que sugiere que los anticuerpos NILO están reconociendo estructuras de superficie esenciales en la biología de estas células progenitoras.

EJEMPLO 6. Identificación de células precursores no neurales identificadas por NILO1.

El análisis de otros tejidos con los anticuerpos monoclonales NILO, demostró que existen otras poblaciones minoritarias fuera del territorio neural que son también marcadas con estos anticuerpos. En concreto, dos poblaciones de células precursoras que son identificadas con el anticuerpo NILO1 son las células precursoras mesenquimales de la médula ósea y las células precursoras de tejido mamario.

Se identificó un pequeño porcentaje de células marcadas con NILO1 en médula ósea y su posible implicación en su conversión con tejido neural en transplantes en cerebros de ratones neonatos. Se investigó y se analizó que tipo de células eran marcadas por NILO1 en médula ósea. Se prepararon células mesenquimales, mediante adherencia al plástico en medio de cultivo con suero fetal, resultando que las células adherentes y que tapizaban el cultivo a los pocos días de su siembra, eran positivas para NILO1 (Figura 10). Estas células, son consideradas mesenquimales ya que en condiciones de cultivo de tejido neural (medio de cultivo para crecer neuroesferas) estás células adquirían marcadores de nestina y NILO1, así como Sca-1, y de las integrinas alfa6 y beta 1. Además, estos marcadores se perdían cuando se diferenciaban en medio sin factores FGF2 y EGF, hacia células Tubulina βIII+, lo que sugería su posible origen mesenquimal. Además en condiciones de cultivo para diferenciación de células mesenquimales en adipocitos estas células eran capaces en cultivos de 6 semanas de generar células con grasa (Figura 10h) y marcadas con Red Oil (Figura 10g), lo que demuestra su capacidad para generar diversos tipos de tejidos derivados del mesenquimal.

EJEMPLO 7. Identificación de células precursoras de tejido mamario con NILO1.

En condiciones de disgregación del tejido mamario de ratones de seis semanas, se ha observado que NILO1 es capaz de identificar un pequeño porcentaje de células (<3%). Estas células, capaces de formar mamoesferas, eran débilmente marcadas con Sca-1, lo que sugería que podrían tratarse de células precursoras (Figura 11b). Para demostrar este punto, células disgregadas de tejido mamario se marcaron con el anticuerpo NILO1 y se separaron en esterilidad, las células NILO1+ y las NILO1-, fueron luego usadas en transplantes de tejido precursor mamario en la grasa mamaria de ratones de laboratorio y la presencia de estructuras tridimensionales mamarias analizadas a las 8 semanas, post transplante (Figura 11c). Como se observa, 1200 células de una selección mediante citometría de células NILO1, eran capaces de reconstituir una mama tridimensional. Estos datos, apuntan a que NILO1 puede reconocer estructuras en células progenitoras de tejido mamario.

REIVINDICACIONES

1. Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana de células progenitoras neurales que comprende:
    a. generación de neuroesferas que contengan células madre neurales a partir del bulbo olfativo de un embrión de ratón de 13,5 días de edad.
    b. Inmunización de un hámster armenio macho de 4 meses de edad con células viables de neuroesferas
    c. Obtención de los linfocitos mediante la extracción del bazo de dicho animal
    d. Fusión de los linfocitos con células de mieloma no-productor de ratón pertenecen al ratón Balb.c dando lugar a células híbridas o hibridomas
    e. Determinación y/o selección de los anticuerpos producidos por los hibridomas mediante citometría de flujo de células de neuroesferas en presencia de ioduro de propidio.

2. Anticuerpo monoclonal seleccionado de la siguiente lista:
    a. Anticuerpo monoclonal, denominado NILO1, producido por el hibridoma depositado bajo el número de acceso DSM No. ACC2887 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania.
    b. Anticuerpo monoclonal, denominado NILO2, producido por el hibridoma depositado bajo el número de acceso DSM No. ACC2881 en autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania.

3. Fragmento/s inmunologicamente activos de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la reivindicación 2.

4. Construcción genética de ADN capaz de transcribirse a un anticuerpo/s o fragmento/s de anticuerpo/s de la invención, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5. Hibridomas productores de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la reivindicación 2.

6. Método para producir una población enriquecida en células progenitoras, que comprende:
   a. Poner en contacto una población de células con un reactivo que reconoce un epítopo o determinante antigénico en un marcador de superficie celular reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o el anticuerpo monoclonal NILO2; y
   b. selección de las células en las que existe un contacto entre el reactivo y el epítopo o determinante antigénico.

7. Método según la reivindicación anterior, donde l población enriquecida en células progenitoras contiene células progenitoras neurales o células derivadas neurales.

8. Método según la reivindicación anterior, donde la población conteniendo células progenitoras neurales o células derivadas neurales se obtiene de un cultivo de neuroesferas.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el reactivo se selecciona de una lista que comprende:

a. un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un epítopo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1,
b. un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un epítopo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 2,
c. un anticuerpo NILO 1, o fragmento del mismo,
d. un anticuerpo NILO 2, o fragmento del mismo,
e. un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO1,
f. un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO2,
g. un fluorocromo conjugado, y
h. un conjugado con partículas magnéticas.

10. Método según las reivindicaciones 6-9, donde el reactivo contiene el anticuerpo monoclonal NILO1 y/o NILO 2, acoplado o acoplados a marcadores como enzimas, cromóforos, materiales quimioluminiscentes, radionucleótidos o nanopartículas.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-10 donde la selección de las células progenitoras se realiza mediante técnicas de citometría de flujo (incluyendo citometría de flujo FACS) o de microscopía, o utilizando técnicas de inmunocitoquímica (células) o inmunohistoquímica (tejido), o por selección magnética o por cualquier otro método de selección positiva.

12. Población enriquecida de células madre o células progenitoras obtenible según el método de cualquiera de las reivindicaciones 6-11.

13. Población según la reivindicación anterior para su uso como medicamento.

14. Población según la reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de patologías degenerativas o que cursen con procesos de destrucción tisular.

15. Método de *screening* o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:
    a. seleccionar de una población que contiene células madre o células progenitoras que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o al anticuerpo monoclonal NILO 2, o a un fragmento o fragmentos del o de los mismos, y de este modo producir una población enriquecida para células madre.
    b. inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida.
    c. administrar una composición con potencial farmaceútico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y
    d. comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

16. Método de screening o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:
    a. seleccionar de una población que contiene células madre o células progenitoras que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1, o un fragmento del mismo, y enriquecer más aún dicha población por selección adicional de las células que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 2, o a un fragmento del mismo, y

de este modo producir una población enriquecida para células madre si se compara con la población de células original,

b. inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida para células madre o células progenitoras,

c. administrar una composición con potencial farmaceútico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y

d. comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

17. Método según las reivindicaciones 15 y 16 donde el mamífero no humano es un roedor.

18. Método según las reivindicaciones 15-16 donde las células madre o células progenitoras son células madre neurales o células progenitoras neurales.

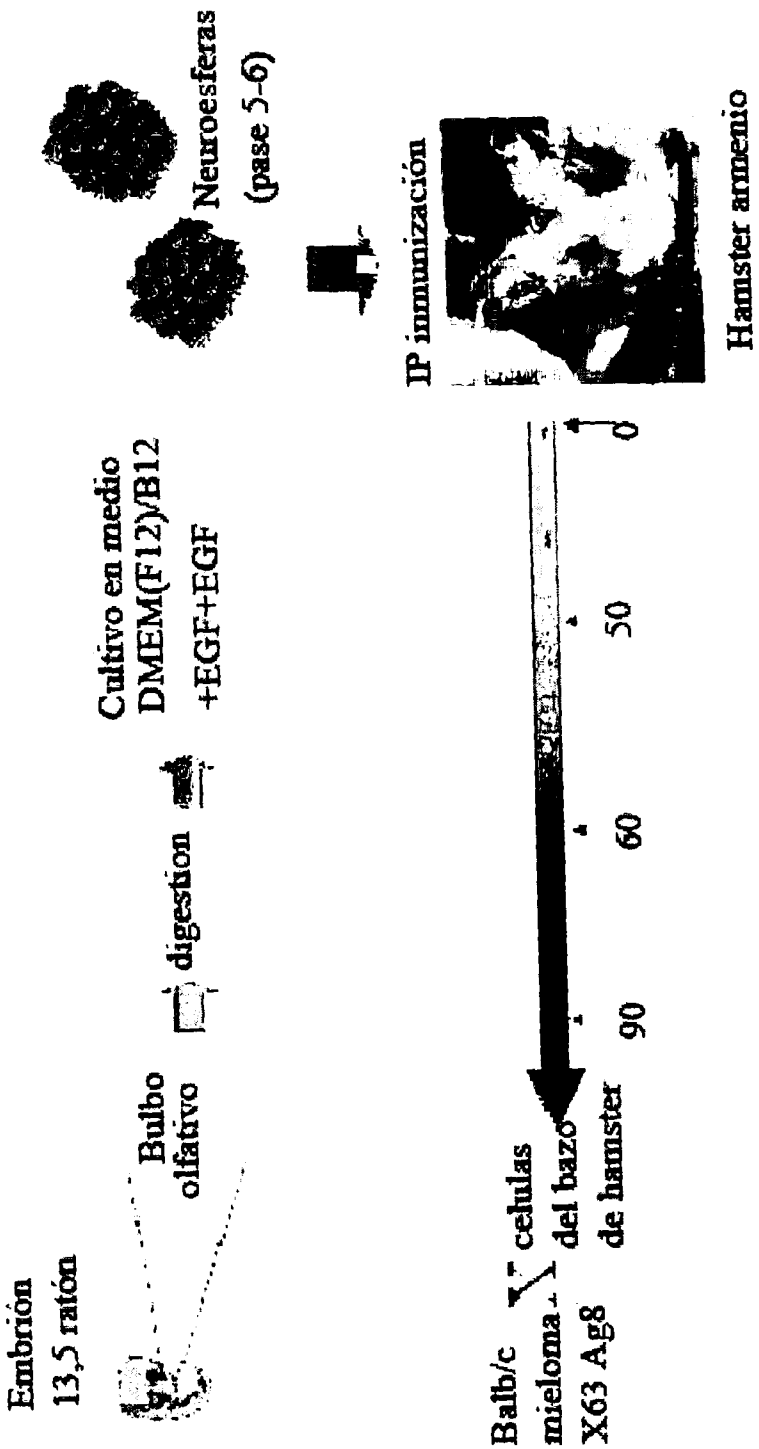
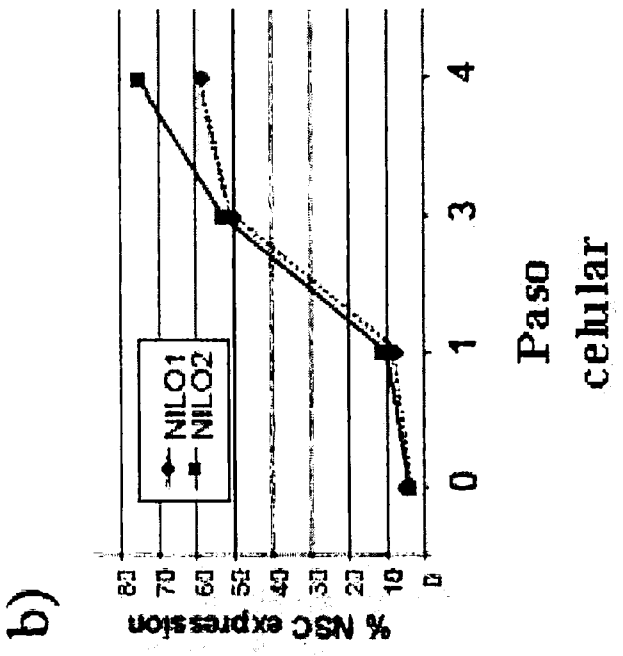

Embrión
13,5 ratón
Bulbo olfativo
digestion
Cultivo en medio
DMEM(F12)/B12
+EGF+EGF
Neuroesferas
(pase 5-6)
IP inmunización
Hamster armenio
Balb/c
mieloma
X63 Ag8
células
del bazo
de hamster
90
60
50
0

FIG.1


b)
% NSC expression
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NILO1
NILO2
0
1
3
4
Paso
celular

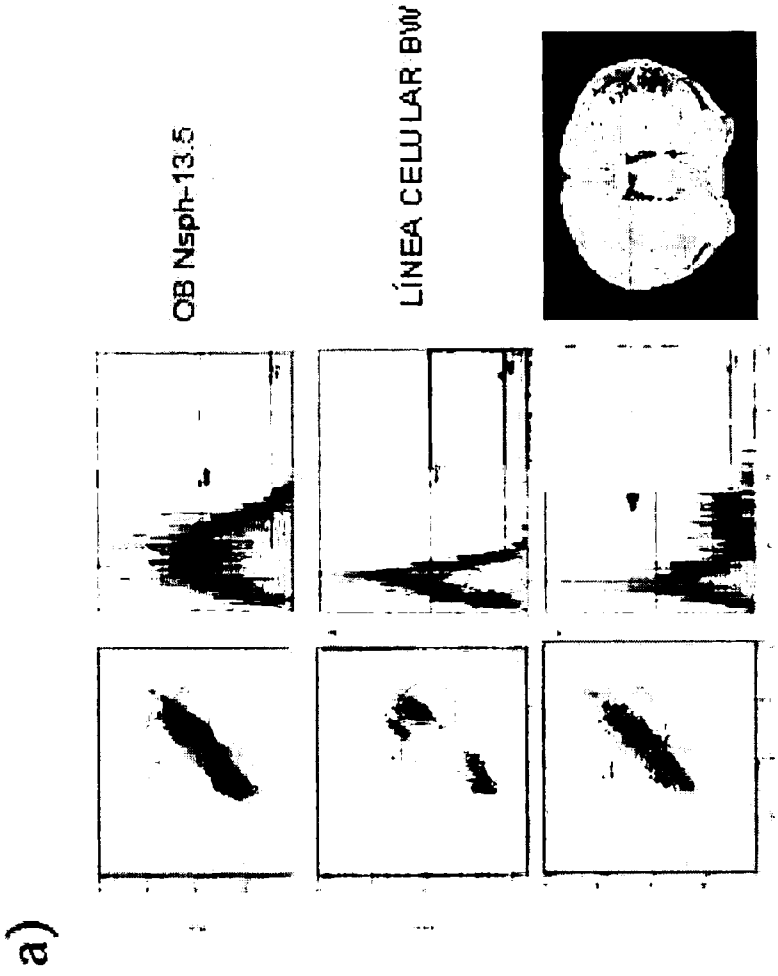

a)
OB Nsph-13.5
LÍNEA CELULAR BW

FIG. 2

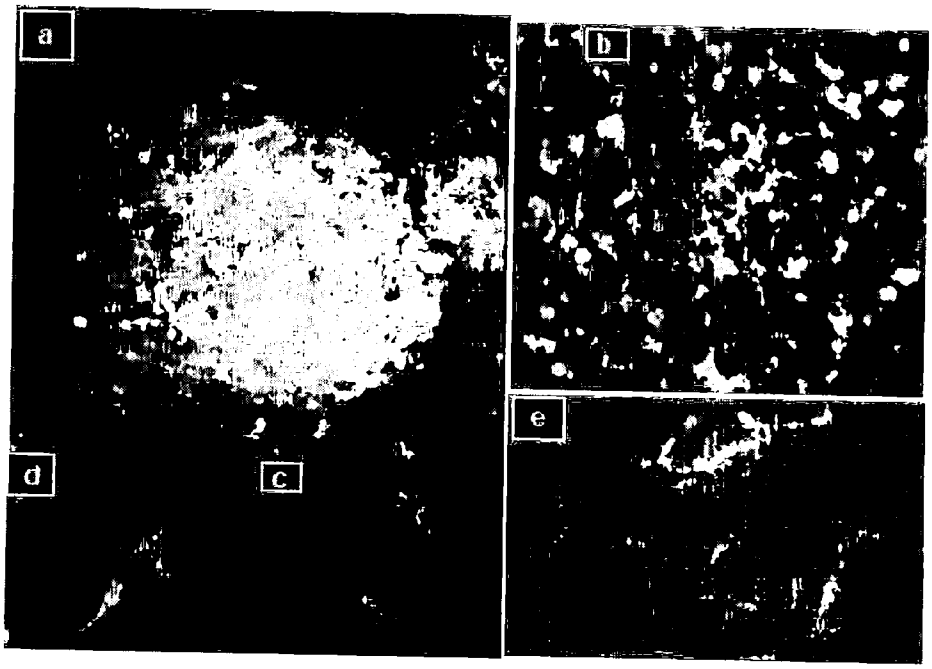


FIG. 3

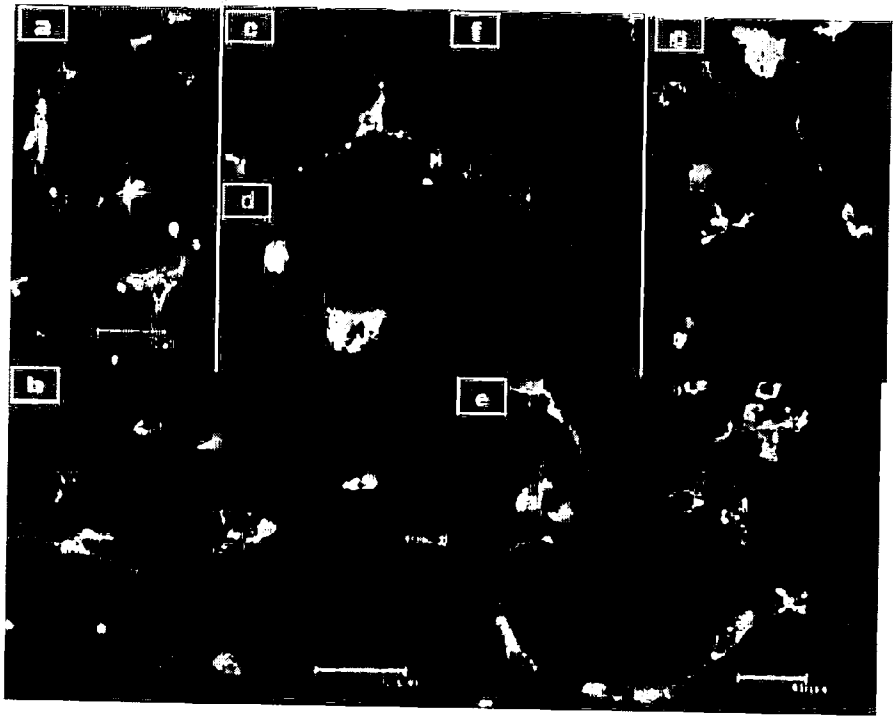


FIG. 4

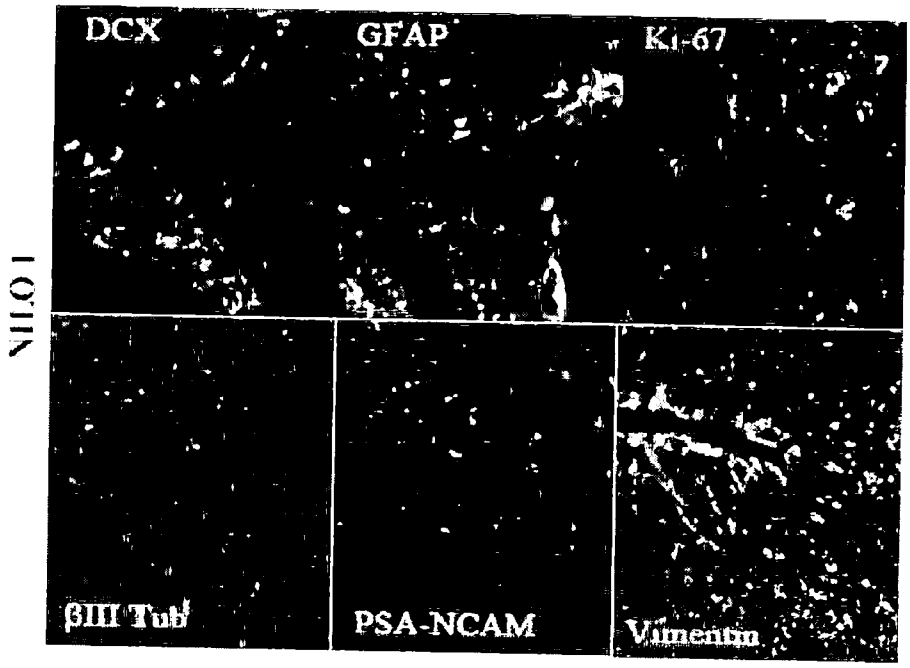

NILO 1
DCX
GFAP
Ki-67
βIII Tub
PSA-NCAM
Vimentin

FIG. 5

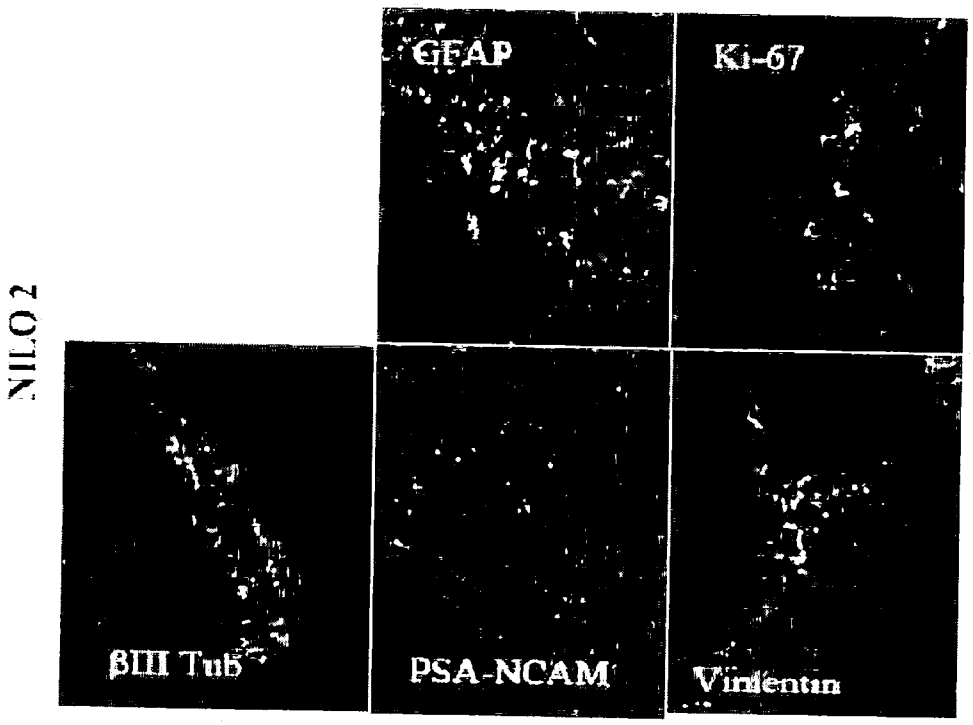

NILO 2
GFAP
Ki-67
βIII Tub
PSA-NCAM
Vimentin

FIG. 6

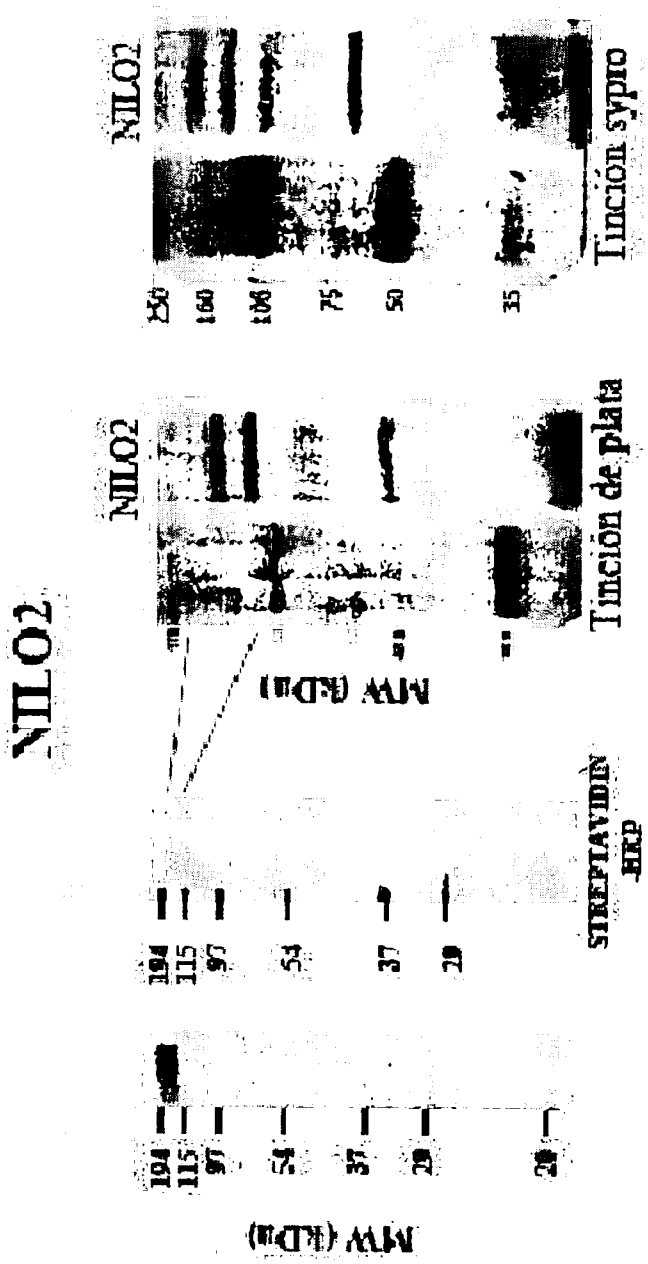

NILO2
Tinción sypro
NILO2
Tinción de plata
NILO2
STREPTAVIDIN HRP
MW (kDa)
MW (kDa)

FIG. 7

Efecto de los anticuerpos NILO en la proliferación celular

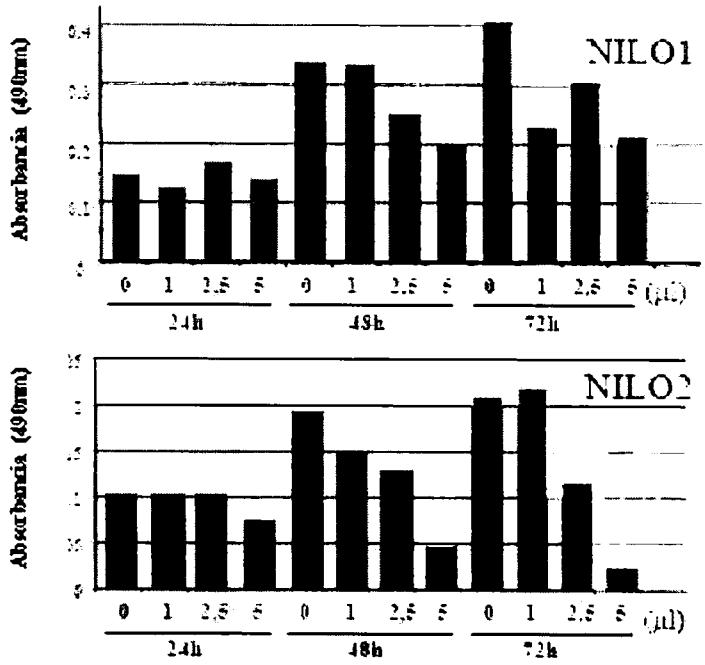


FIG. 8

Efecto de los anticuerpos NILO en la diferenciación

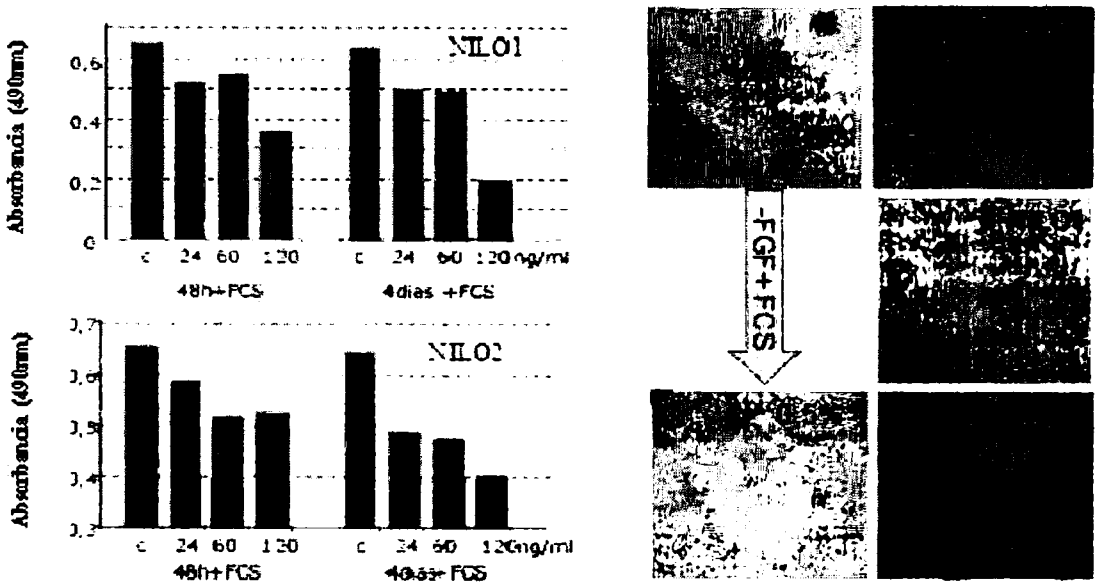


FIG. 9

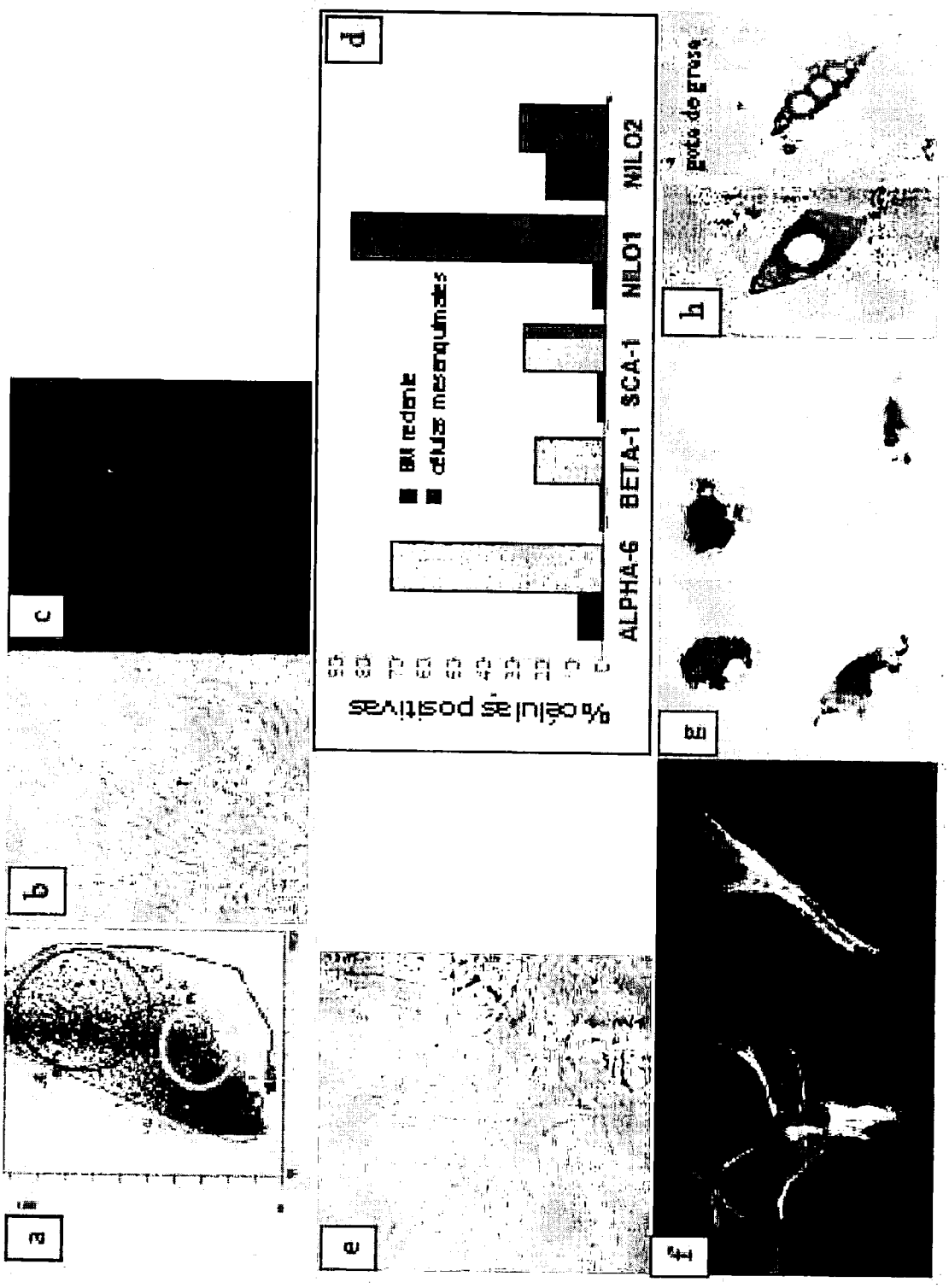
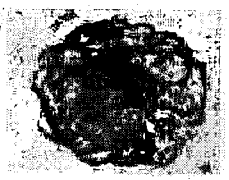
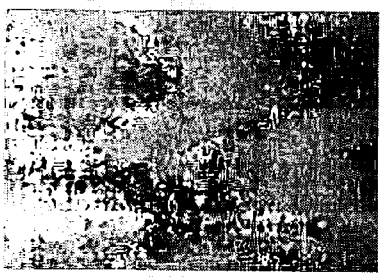

a
b
c
d
e
f
g
h
% células positivas
0
10
20
30
40
50
ALPHA-6
BETA-1
SCA-1
NILO1
NILO2
BM redonte
cellules mesenquimales
gouta de grasa

FIG. 10

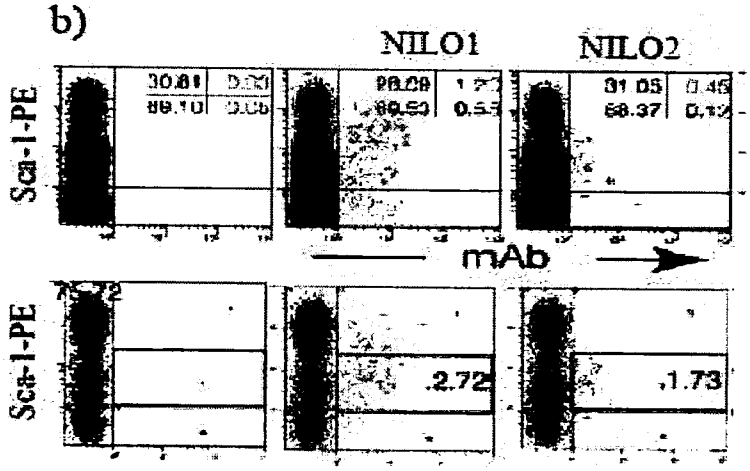
a)



mamoesferas



b)



c)

NILO1-	Left	NILO1+	Right
40000	3/3	10000	1/3
20000	3/3	5000	2/3
10000	3/3	2500	1/3
5000	1/3	1200	2/3
2500	2/3	500	0/3

FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/114634 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 11.10.2007, examples 1-3.	1
Y	VERGAÑO-VERA, E., YUSTA-BOYO, M. J., DE CASTRO, F. et al. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. Development. November 2006, Vol. 133, Nº 21, pages 4367-4379. ISSN 0950-1991.	1
A	JP 2007055965 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN SANGYO GIJUTSU SO) 08.03.2007, (abstract) WPI database, Thomson Scientific, London [on line] [retrieved on 15.07.2009] Retrieved from: EPOQUE. DW200741, Access number 2007- 24090 [41]	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 July 2009 (14.07.2009)	**(21/07/09)**
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer E. Relaño Reyes Telephone No. +34 91 349 85 04

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070130

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VICARIO-ABEJÓN, C., YUSTA-BOYO, M. J., FERNÁNDEZ-MORENO, C., DE PABLO, F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. The Journal of Neuroscience. February 2003, Vol. 23, Nº 3, pages 895-906. ISSN 0270-6474.	1
A	RITTER, M. A., LADYMAN, H. M. Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application. First Edition. New York: Cambridge University Press. 1995. Chapter 2: Production of Monoclonal Antibodies, paragraph 2.2.5 (pages 13, 14).	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070130

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 2, 6, 9, 10, 15, 16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

El objeto de las reivindicaciones 2, 6, 9, 10, 15 y 16 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT debido a los siquientes motivos: reivindicaciones 2, 9, 10, 15 y 16: no se definen de manera clara los anticuerpos de la invención; reivindicaciones 6 y 9 no se definen los epítopos.

3. ☒ Claims Nos.: 3-5, 7, 8, 11-14, 17, 18
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070130

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007/114634 A1	11.10.2007	KR 20070099186 A	09.10.2007
JP 2007055965 A	08.03.2007	NONE	----------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070130

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/070130

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
Y	WO 2007/114634 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 11.10.2007, ejemplos 1-3.	1
Y	VERGAÑO-VERA, E., YUSTA-BOYO, M. J., DE CASTRO, F. et al. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. Development. Noviembre 2006, Vol. 133, Nº 21, páginas 4367-4379. ISSN 0950-1991.	1
A	JP 2007055965 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN SANGYO GIJUTSU SO) 08.03.2007, (resumen) Base de datos WPI Thomson Scientific, Londres [en línea] [recuperado el 15.07.2009] Recuperado de: EPOQUE. DW200741, Nº acceso 2007-424090 [41]	1

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
14 Julio 2009 (14.07.2009)	**21 DE JULIO DE 2009 (21/07/09)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono +34 91 349 85 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ES 2009/070130

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
A	VICARIO-ABEJÓN, C., YUSTA-BOYO, M. J., FERNÁNDEZ-MORENO, C., DE PABLO, F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. The Journal of Neuroscience. Febrero 2003, Vol. 23, Nº 3, páginas 895-906. ISSN 0270-6474.	1
A	RITTER, M. A., LADYMAN, H. M. Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application. Primera Edición. Nueva York: Cambridge University Press. 1995. Capítulo 2 :Production of Monoclonal Antibodies, apartado 2.2.5 (páginas 13, 14).	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/070130

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones Nos:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones Nos: 2, 6, 9, 10, 15, 16
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 2, 6, 9, 10, 15 y 16 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT debido a los siquientes motivos: reivindicaciones 2, 9, 10, 15 y 16: no se definen de manera clara los anticuerpos de la invención; reivindicaciones 6 y 9 no se definen los epítopos.

3. ☒ Las reivindicaciones Nos: 3-5, 7, 8, 11-14, 17, 18
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones Nos:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones Nos:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecidopara ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional Nº

PCT/ES 2009/070130

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2007/114634 A1	11.10.2007	KR 20070099186 A	09.10.2007
JP 2007055965 A	08.03.2007	NINGUNO	----------

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/070130

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)