

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 698**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0781

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2017** **PCT/EP2017/057250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017** **WO17167714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2017** **E 17713677 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2023** **EP 3436571**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de linfocitos B**

30 Prioridad:

30.03.2016 EP 16162954

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

24.10.2023

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

OFFNER, SONJA y
JUNG, FRIEDERIKE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 951 698 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

Procedimiento de cultivo de linfocitos B

5 En el presente documento se informa de procedimientos para cocultivar linfocitos B con células alimentadoras EL4-B5, que se han obtenido de un cultivo de células EL4-B5 de una determinada densidad celular, obteniendo la secuencia de aminoácidos de al menos los dominios variables de un anticuerpo monoclonal secretado por un solo linfocito B, y para producir el anticuerpo.

10 Antecedentes de la invención

Para obtener células que secreten anticuerpos monoclonales se usa ampliamente la tecnología de hidridoma desarrollada por Koehler y Milstein. Sin embargo, en la tecnología de hibridoma solo se puede fusionar y propagar una fracción de linfocitos B obtenidos de un animal de laboratorio inmunizado. La fuente de los linfocitos B es en general un órgano de un animal de laboratorio inmunizado tal como el bazo.

15 Zubler *et al.* comenzaron en 1984 a desarrollar un enfoque diferente para obtener células que secretan anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Eur. J. Immunol. 14 (1984) 357-363, J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183). En el presente documento los linfocitos B se obtienen de la sangre del animal de laboratorio inmunizado y se cocultivan con células alimentadoras EL4-B5 murinas en presencia de una mezcla alimentadora que comprende citocinas. Con esta metodología se pueden obtener hasta 50 ng/ml de anticuerpo después de 10-12 días de cocultivo.

25 Weitkamp, J-H., *et al.*, (J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237) informan de la generación de anticuerpos monoclonales humanos recombinantes para rotavirus a partir de linfocitos B específicos de antígeno individuales seleccionados con partículas similares a virus fluorescentes. Se informa de un procedimiento de producción de una pluralidad de anticuerpos aislados para una pluralidad de antígenos análogos en el documento US 2006/0051348. En los documentos WO 2008/144763 y WO 2008/045140 se informa de anticuerpos para IL-6 y usos de los mismos y un procedimiento de cultivo para obtener una población clonal de linfocitos B específicos de antígeno, respectivamente. Se informa de un procedimiento de cultivo para obtener una población clonal de linfocitos B específicos de antígeno en el documento US 2007/0269868. Masri *et al.* (Mol. Immunol. 44 (2007) 2101-2106) informan de la clonación y expresión en *E.coli* de un fragmento Fab funcional obtenido de un linfocito humano individual contra la toxina de carbunco. Se informa de un procedimiento para preparar colecciones de inmunoglobulina en el documento WO 2007/031550.

35 En el documento WO 2011/147903 se informa de un procedimiento de cultivo de linfocitos B individuales.

En el documento WO 2013/076139 se informa de células de mamífero que expresan CD40L y su uso.

40 En el documento WO 2013/092716 se informa de un procedimiento rápido para la clonación y expresión de segmentos génicos de la región variable de anticuerpos análogos.

En el documento US 7.807.415 se informa de procedimientos para producir linfocitos B inmortalizados estables. En el documento EP 0 488 470 se informa de procedimientos para la producción de anticuerpos.

45 Seeber, S., *et al.* informaron de una plataforma de alto rendimiento robusta para generar anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales usando linfocitos B de conejo de sangre periférica (PLOS One 9 (2014) e86184/-14).

En el documento US 2007/065919 se informa de procedimientos de producción de linfocitos B estables.

50 En el documento WO 2012/178150 se informa de procedimientos para desarrollar líneas celulares productoras de anticuerpos específicos de antígeno y anticuerpos monoclonales.

55 Kwekkeboom, J., *et al.* informó de un procedimiento eficaz para la generación de anticuerpos monoclonales humanos basado en la activación de linfocitos B humanos por una línea celular de timoma murino (J. Immunol. Meth. 160 (1993) 117-127).

Weber, M., *et al.*, informaron de la combinación de estimulación de linfocitos B basada en EL4-B5 y tecnología de presentación en fagos para el aislamiento exitoso de fragmentos de autoanticuerpo anti-Scl-70 humanos (J. Immunol. Meth. 278 (2003) 249-259).

60 Dohmen, S.E., *et al.* informaron de la producción de moléculas de Ig recombinantes de linfocitos B individuales seleccionados por antígeno y el uso restringido de segmentos génicos de Ig por anticuerpos anti-D (J. Immunol. Meth. 298 (2005) 9-20).

65

Sumario de la invención

En el presente documento se informa de un procedimiento para el cocultivo de linfocitos B depositados individuales, que pueden ser de cualquier fuente, con células alimentadoras en un medio de cocultivo adecuado.

La invención se basa al menos en parte en el hallazgo de que las células alimentadoras EL4-B5 usadas en el cocultivo se pueden obtener de un cultivo de células EL4-B5 que tiene una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml, es decir, las células EL4-B5 se han cultivado hasta dicha densidad celular.

La invención se basa además, al menos en parte, en el hallazgo de que en general la frecuencia de unión a antígeno y pocillos positivos para IgG entre todos los pocillos positivos para IgG se incrementa dependiendo de la densidad de cultivo de EL4-B5 en el momento de la obtención de las células EL4-B5, es decir si las células EL4-B5 obtenidas de cultivos EL4-B5 con densidades celulares mayores en el momento de la obtención de las células EL4-B5 se usan en cocultivos de linfocitos B, se puede obtener el incremento de frecuencia mencionado anteriormente. Este efecto se observó cuando se usaron en el cocultivo células EL4-B5 obtenidas de un cultivo de células EL4-B5 con una densidad celular de hasta 1.500.000 células/ml. Es decir, usando la misma concentración de células EL4-B5 que antes en el cocultivo da como resultado una frecuencia incrementada de unión a antígeno y pocillos positivos para IgG cuando las células EL4-B5 se han cultivado hasta una densidad celular final de más de 1.000.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Los aspectos individuales como se divulgan en el presente documento procedimientos son procedimientos para

- i) el aislamiento de un linfocito B o un clon de linfocito B de una población de linfocitos B, con lo que el linfocito B o clon de linfocito B aislado produce un anticuerpo que se une específicamente a una diana,
- ii) el cocultivo de linfocitos B depositados individuales, y
- iii) la producción de un anticuerpo.

Simultáneamente con los procedimientos también se divulgan los correspondientes usos.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para cocultivar uno o más linfocitos B que comprende la etapa de

- incubar el uno o más linfocitos B con células EL4-B5,

con lo que las células EL4-B5 se han obtenido/son de un cultivo de células EL4-B5 que tiene una densidad celular (final) de más de 1.000.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

En un modo de realización, el cultivo de células EL4-B5 tiene una densidad celular (final) de 1.400.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para cocultivar uno o más linfocitos B que comprende las etapas de

- cultivar células EL4-B5 hasta una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml a 1.500.000 células/ml, e
- incubar el uno o más linfocitos B con una alícuota de 10^4 a 10^5 células EL4-B5 de/del cultivo de las células EL4-B5 de la etapa previa, es decir, del cultivo de células EL4-B5 que tiene una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml a 1.500.000 células/ml.

En un modo de realización, el cultivo de dichas células EL4-B5 es hasta una densidad celular (final) de 1.400.000 células/ml a 1.500.000 células/ml.

En un modo de realización de todos los aspectos, las células EL4-B5 se irradian con radiación y antes de la adición al uno o más linfocitos B. La dosis de radiación y es una dosis subletal. En un modo de realización, las células EL4-B5 se obtienen cuando el cultivo de dichas EL4-B5 tiene una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml a 1.500.000 células/ml, la densidad celular en la obtención se ajusta hasta una densidad celular de 1×10^6 células/ml, la suspensión celular de EL4-B5 ajustada a la densidad celular se irradia con radiación y de una dosis de 50 Gy, y se añade una respectiva alícuota de las células EL4-B5 irradiadas al uno o más linfocitos B. En todos los modos de realización, la alícuota es de 10^4 a 10^5 células EL4-B5 por linfocito B.

El uno o más linfocitos B se incuban con de 10^4 a 10^5 células EL4-B5 por linfocito B. En un modo de realización de todos los aspectos, el uno o más linfocitos B se incuban con de 1×10^4 a 5×10^4 células EL4-B5 por linfocito B. En un modo de realización de todos los aspectos, el uno o más linfocitos B se incuban con 2×10^4 células EL4-B5 por linfocito B. Por tanto, la alícuota del cultivo de las células EL4-B5 que se añade a uno o más linfocitos B es de 10^4 a 10^5 , o de 1×10^4 a 5×10^4 , o 2×10^4 células EL4-B5 por linfocito B.

En un modo de realización de todos los aspectos, la incubación es adicionalmente en presencia de una mezcla alimentadora.

5 En un modo de realización, la mezcla alimentadora comprende uno o más de

i) interleucina-1 beta y factor de necrosis tumoral alfa,

10 ii) interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-10 (IL-10),

iii) células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC),

iv) interleucina-21 (IL-21) y opcionalmente interleucina-2 (IL-2),

15 v) factor de activación de linfocitos B de la familia del factor de necrosis tumoral (BAFF),

vi) interleucina-6 (IL-6),

20 vii) interleucina-4 (IL-4), y

viii) sobrenadante de cultivo de timocitos.

En un modo de realización, la mezcla alimentadora comprende células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC) y sobrenadante de cultivo de timocitos.

25 En un modo de realización de todos los aspectos, el procedimiento es para el cocultivo de un linfocito B. En un modo de realización preferente, el linfocito B es un linfocito B depositado individual.

30 En un modo de realización de todos los aspectos, la incubación es durante de 5 a 14 días.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende el procedimiento de cocultivo como se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto y de este modo producir un anticuerpo.

35 Todos los aspectos (procedimientos y usos) como se informa en el presente documento comprenden la etapa de

- (individualmente) cocultivar/incubar (cada uno depositado o un grupo de) linfocito(s) B con células alimentadoras EL4-B5 en un medio de cocultivo, que se ha complementado con una mezcla alimentadora.

40 El resultado del cocultivo es un clon de linfocito B, es decir, una población de linfocitos B que son la descendencia de un linfocito B individual.

En un modo de realización, los procedimientos como se informa en el presente documento comprenden antes de la etapa de cocultivo, la siguiente etapa:

45 - depositar aquellos linfocitos B de una población de linfocitos B que se han marcado con de uno a tres o de uno a cuatro tintes de fluorescencia/fluoróforos como células individuales.

En un modo de realización, los procedimientos como se informa en el presente documento comprenden antes de la etapa de cocultivo, la siguiente etapa:

50 - depositar aquellos linfocitos B de una población de linfocitos B como células individuales que se han puesto en contacto con de uno a cuatro anticuerpos, uniéndose específicamente cada uno a un antígeno de superficie de linfocito B diferente, con lo que cada anticuerpo se conjuga con un tinte fluorescente diferente, pero se marca solo con de uno a cuatro tintes de fluorescencia.

El marcaje es en un modo de realización poniendo en contacto la población de linfocitos B (secuencial o simultáneamente) con de uno a cuatro anticuerpos marcados de forma fluorescente. De este modo se obtiene una preparación de linfocitos B marcada. Cada uno de los anticuerpos marcados de forma fluorescente se une a una diana/marcador de superficie de linfocitos B diferente.

60 El depósito es introduciendo la preparación de linfocitos B marcados en un citómetro de flujo y depositando esas células como células individuales que se han marcado con de uno a cuatro marcadores fluorescentes. Como es

65 posible incubar las células con más tintes fluorescentes que los que se usan para seleccionar las células en el separador celular, las células se pueden seleccionar por la presencia de marcadores de superficie específicos y (opcionalmente) simultáneamente por la ausencia de otros marcadores de superficie.

El marcaje y el depósito de células individuales se realizan para reducir la complejidad de la población de linfocitos B disminuyendo los linfocitos B que probablemente no produzcan un anticuerpo que tenga las características destinadas. Los anticuerpos marcados se unen a un polipéptido específico presentado en la superficie de linfocitos B y por tanto proporcionan un marcador de selección positiva. Del mismo modo, también es posible seleccionar células que solo están marcadas con un número reducido de tintes fluorescentes en comparación con el número de anticuerpos marcados con los que se había incubado el linfocito B, tales como por ejemplo, células que tienen un marcador fluorescente de dos (es decir, se ha realizado la incubación con dos anticuerpos marcados de forma fluorescente pero solo uno de los mismos se une a los linfocitos B), o dos de tres. En base a la unión/no unión de los anticuerpos marcados de forma fluorescente a los linfocitos B individuales de la población de linfocitos B, es posible identificar y separar linfocitos B diana usando un aparato de separación de microfluidos. Simultáneamente con la selección también se puede determinar la cantidad del marcador.

En un modo de realización, los procedimientos como se informa en el presente documento comprenden la etapa de incubar la población de linfocitos B en el medio de cocultivo antes de depositar/deposito de células individuales. En un modo de realización la incubación es a aproximadamente 37 °C. En un modo de realización la incubación es durante 0,5 a dos horas. En un modo de realización, la incubación es durante aproximadamente una hora. En un modo de realización preferente, la incubación es a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente una hora.

En un modo de realización, los procedimientos como se informa en el presente documento comprenden después de la etapa de depósito y antes de la etapa de cocultivo la etapa de centrifugar los linfocitos B depositados de células individuales. En un modo de realización, la centrifugación es durante de aproximadamente 1 min a aproximadamente 30 min. En un modo de realización, la centrifugación es durante aproximadamente 5 min. En un modo de realización, la centrifugación es a de aproximadamente 100 x g a aproximadamente 1000 x g. En un modo de realización, la centrifugación es a aproximadamente 300 x g. En un modo de realización preferente, la centrifugación es durante de aproximadamente 5 min a aproximadamente 300 x g.

El procedimiento de las reivindicaciones se puede usar en un procedimiento para seleccionar/obtener un linfocito B (clon) que comprende las siguientes etapas:

a) marcar los linfocitos B de una población de linfocitos B con de uno a cuatro tintes fluorescentes (opcionalmente incubando la población de linfocitos B con de dos a cuatro anticuerpos marcados de forma fluorescente que se unen específicamente a de dos a cuatro marcadores de superficie de linfocitos B predeterminados diferentes),

b) opcionalmente incubar las células en medio de cocultivo,

c) depositar los linfocitos B de la población de linfocitos B que se han marcado con de uno a cuatro tintes fluorescentes (y opcionalmente no marcados con el/los otro(s) tinte(s) fluorescente(s)) como células individuales en células alimentadoras precargadas,

d) opcionalmente centrifugar los linfocitos B depositados individuales con las células alimentadoras precargadas,

e) (individualmente) cocultivar cada linfocito B depositado individual con células alimentadoras en un medio de cocultivo, que se ha complementado con una mezcla alimentadora,

f) seleccionar un clon de linfocito B que prolifera y secreta un anticuerpo en la etapa e).

El procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención es como se define en la reivindicación 10. En un modo de realización, el procedimiento para producir un anticuerpo que se une específicamente a una diana comprende las siguientes etapas

a) marcar los linfocitos B de una población de linfocitos B con de uno a cuatro tintes fluorescentes (opcionalmente incubando la población de linfocitos B con de dos a cuatro anticuerpos marcados de forma fluorescente que se unen específicamente a de dos a cuatro marcadores de superficie de linfocitos B predeterminados diferentes),

b) opcionalmente incubar las células en medio de cocultivo,

c) depositar los linfocitos B de la población de linfocitos B que se han marcado con de uno a cuatro tintes fluorescentes (y opcionalmente no marcados con el/los otro(s) tinte(s) fluorescente(s)) como células individuales en células alimentadoras precargadas,

d) opcionalmente centrifugar los linfocitos B depositados individuales con las células alimentadoras precargadas,

e) (individualmente) cocultivar cada linfocito B depositado individual con células alimentadoras en un medio de cocultivo, que se ha complementado con una mezcla alimentadora,

5 f) seleccionar un clon de linfocito B de la etapa e) que secreta un anticuerpo,

g) i) obtener uno o más ácidos nucleicos que codifican los dominios variables del anticuerpo secretado del clon de linfocito B seleccionado en la etapa f),

10 ii) si el clon de linfocito B no es un clon de linfocito B humano humanizar los dominios variables y proporcionar los respectivos ácidos nucleicos codificantes, y

iii) introducir el uno o más ácidos nucleicos en uno o más vectores de expresión,

15 h) cultivar una célula, que se ha transfectado con el uno o más vectores de expresión de la etapa g), y recuperar el anticuerpo de la célula o del sobrenadante de cultivo y de este modo producir el anticuerpo.

En un modo de realización, el procedimiento para producir un anticuerpo que comprende las siguientes etapas

20 a) marcar los linfocitos B de una población de linfocitos B con de uno a cuatro tintes fluorescentes (opcionalmente incubando la población de linfocitos B con de dos a cuatro anticuerpos marcados de forma fluorescente que se unen específicamente a de dos a cuatro marcadores de superficie de linfocitos B predeterminados diferentes),

25 b) opcionalmente incubar las células en medio de cocultivo,

c) depositar los linfocitos B de una población de linfocitos B que se han marcado con de uno a cuatro tintes fluorescentes (y opcionalmente no marcados con el/los otro(s) tinte(s) fluorescente(s)) como células individuales en células alimentadoras precargadas,

30 d) opcionalmente centrifugar los linfocitos B depositados individuales con las células alimentadoras precargadas,

35 e) (individualmente) cocultivar cada linfocito B depositado individual con células alimentadoras en un medio de cocultivo, que se ha complementado con una mezcla alimentadora,

f) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el medio de cultivo de los linfocitos B individuales,

40 g) obtener uno o más ácidos nucleicos que codifican los dominios variables del anticuerpo secretado del clon de linfocito B por una PCR con retrotranscriptasa y secuenciación de nucleótidos (y de este modo obtener un ácido nucleico que codifica el dominio de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpo monoclonal)

45 h) si el linfocito B es un linfocito B no humano humanizar el dominio de la cadena ligera y pesada variable y proporcionar un ácido nucleico que codifica los dominios variables humanizados,

i) introducir el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpo monoclonal en uno o más vectores de expresión para la expresión de un anticuerpo (humano o humanizado),

50 j) introducir el/los vector(es) de expresión en una célula,

k) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo de la célula o del sobrenadante de cultivo celular y de este modo producir el anticuerpo.

55 En un modo de realización, la obtención de uno o más ácidos nucleicos que codifican los dominios variables del anticuerpo secretado del clon de linfocito B comprende las siguientes etapas:

60 - extraer ARN total del clon de linfocito B productor de anticuerpos,

- realizar una síntesis de ADNc monocatenario/transcripción inversa del ARNm poliA⁺ extraído,

- realizar una PCR con un conjunto de cebadores específicos de especie,

65 - opcionalmente retirada del cebador de PCR/purificación del producto de PCR,

- opcionalmente secuenciación del producto de PCR.

En un modo de realización, la introducción del ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada variable de anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para la expresión de un anticuerpo (humano o humanizado) comprende las siguientes etapas:

- incubación con polimerasa T4 del dominio variable de la cadena ligera y pesada variable,
- linealización y amplificación del vector de expresión,
- incubación con polimerasa T4 del vector de expresión amplificado,
- clonación independiente de secuencia y ligación del ácido nucleico que codifica el dominio variable en el vector de expresión amplificado, y
- preparación del/de los vector(es) del conjunto de células de *E. coli* transformadas con vector.

En un modo de realización de todos los aspectos, el procedimiento comprende de inmediato antes de la etapa de marcaje la siguiente etapa:

- incubar la población de linfocitos B con el antígeno (diana), que se inmoviliza sobre una superficie sólida, y recuperar (solo) los linfocitos B unidos al antígeno inmovilizado.

En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de animales no humanos. En un modo de realización, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de ratón, o una población de linfocitos B de hámster, o una población de linfocitos B de conejo. En un modo de realización preferente, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo.

En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B se obtiene de la sangre de un animal no humano 4 días después de la inmunización. En un modo de realización, la población de linfocitos B se obtiene de la sangre de un animal no humano de desde 4 días hasta como máximo 13 días después de la inmunización.

En un modo de realización, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B humanos.

En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B se obtiene de la sangre por centrifugación por gradiente de densidad.

En un modo de realización de todos los aspectos, los linfocitos B son linfocitos B maduros.

En un modo de realización de todos los aspectos, las células individuales se depositan (individualmente) en los pocillos de una placa multipocillo.

En un modo de realización de todos los aspectos, la mezcla alimentadora es un sobrenadante de cultivo de timocitos (TSN) natural o una mezcla alimentadora sintética. En un modo de realización, el sobrenadante de cultivo de timocitos se obtiene de timocitos del timo de un animal joven.

En un modo de realización de todos los aspectos, la mezcla alimentadora es una mezcla alimentadora sintética. En un modo de realización, la mezcla alimentadora sintética comprende

- i) interleucina-1 beta y factor de necrosis tumoral alfa, y/o
- ii) interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-10 (IL-10), y/o
- iii) células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC), y/o
- iv) interleucina-21 (IL-21) y opcionalmente interleucina-2 (IL-2), y/o
- v) factor de activación de linfocitos B de la familia del factor de necrosis tumoral (BAFF), y/o
- vi) interleucina-6 (IL-6), y/o
- vii) interleucina-4 (IL-4).

En un modo de realización de todos los aspectos, las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas.

En un modo de realización, las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora

comprende IL-1 β , TNF- α , IL-10 y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.

En un modo de realización, las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora comprende IL-1 β , TNF- α , IL-10, SAC e IL-2.

5 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora es sobrenadante de cultivo de timocitos.

10 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora consiste en IL-1 β , TNF- α y dos cualesquiera de IL-2, IL-6 e IL-10.

15 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora consiste en IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10.

20 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora comprende IL-1 β , TNF- α , IL-10, SAC e IL-2 o IL-6.

25 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células EL4-B5 murinas y la mezcla alimentadora comprende IL-1 β , TNF- α , IL-21 y al menos uno de IL-2, IL-10 e IL-6.

En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y las células alimentadoras son células CHO que expresan CD40L de conejo. En un modo de realización, la mezcla alimentadora comprende IL-2 e IL-21 y, opcionalmente, IL-6.

30 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En un modo de realización de todos los aspectos, las células depositadas se marcan con uno o cuatro tintes de fluorescencia y la incubación es con de dos a cuatro anticuerpos marcados de forma fluorescente.

35 En un modo de realización de todos los aspectos, el marcaje de los linfocitos B de la población de linfocitos B da como resultado el marcaje de un 0,1 % a un 2,5 % de las células de la población de linfocitos B (total).

En un modo de realización de todos los aspectos, el marcaje es de IgG de superficie de linfocitos B.

40 En un modo de realización preferente de todos los aspectos, la incubación es con un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente y un anticuerpo anti-IgM marcado de forma fluorescente (el marcaje es de IgG de superficie celular e IgM de superficie celular) y la selección es de células positivas para IgG de superficie celular y negativas para IgM de superficie celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B IgG⁺IgM⁻).

45 En un modo de realización preferente de todos los aspectos, la incubación es con un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente y un anticuerpo anti-IgM marcado de forma fluorescente (el marcaje es de IgG de superficie celular e IgM de superficie celular) y la selección es de células positivas para IgG de superficie celular y negativas para IgM de superficie celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B IgG⁺IgM⁻), con lo que la población de linfocitos B se ha incubado con antígeno (diana), que se inmoviliza en una superficie sólida, y (solo) los linfocitos B unidos al antígeno inmovilizado se han recuperado y sometido a la incubación con los anticuerpos marcados de forma fluorescente.

50 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y la incubación es con un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente (el marcaje es de IgG de superficie celular) y la selección es de células positivas para IgG de superficie celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B IgG⁺).

55 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y la incubación es con un anticuerpo anti-CD138 marcado de forma fluorescente (el marcaje es de CD138 de superficie celular) y la selección es de células positivas para CD138 de superficie celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B CD138⁺).

60 En un modo de realización de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y la incubación es con un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente y un anticuerpo anti-CD138 marcado de forma fluorescente (el marcaje es de IgG de superficie celular y CD138 de superficie celular) y la selección es de células positivas para IgG de superficie celular y también positivas para CD138 de superficie

65

celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B IgG⁺CD138⁺).

En un modo de realización preferente de todos los aspectos, la población de linfocitos B es una población de linfocitos B de conejo y la incubación es con un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente, un anticuerpo anti-IgM marcado de forma fluorescente y opcionalmente un anticuerpo anti-cadena ligera de IgG humana marcado de forma fluorescente en el caso de conejo transgénico humano (el marcaje es IgG de superficie celular, IgM de superficie celular y opcionalmente cadena ligera de IgG humana de superficie celular) y la selección es de células positivas para IgG de superficie celular, negativas para IgM de superficie celular y opcionalmente positivas para cadena ligera de IgG humana de superficie celular (da como resultado el depósito de células individuales de linfocitos B IgG⁺IgM⁻ (opcionalmente linfocitos B IgG⁺IgM⁻hulGLC⁺).

En un modo de realización de todos los aspectos, el cocultivo es en un medio de cocultivo que comprende medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10 % (v/v), una solución de glutamina 200 mM al 1 % (p/v) que comprende penicilina y estreptomicina, 2 % (v/v) de una solución de piruvato de sodio 100 mM, y 1 % (v/v) de tampón ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperacina)-etanosulfónico 1 M (HEPES). En un modo de realización, el medio de cocultivo comprende además beta-mercaptoetanol 0,05 mM.

En un modo de realización, el animal es un animal de laboratorio. En un modo de realización el animal de laboratorio se selecciona de ratón, hámster y conejo. En un modo de realización, el animal de laboratorio es un conejo.

Descripción de las figuras

Figura 1 Frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno por pocillos positivos para IgG.

Figura 2 Frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno por pocillos positivos para IgG.

Definiciones

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

El término "aminoácido" como se usa dentro de esta solicitud indica el grupo de carboxi α -aminoácidos, que directamente o en forma de un precursor se puede codificar por un ácido nucleico. Los aminoácidos individuales se codifican por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de bases. Cada aminoácido se codifica por al menos un codón. Esto es conocido como "degeneración del código genético". El término "aminoácido" como se usa dentro de esta solicitud indica los carboxi α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (glu, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa para indicar anticuerpos naturales incluyendo sus variantes estructurales naturales.

Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales (humanos, de ratón, de rata, de conejo) son glucoproteínas heterotetraméricas con un peso molecular de aproximadamente 150.000 Dalton. Los anticuerpos IgG naturales se componen de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que comprenden enlaces disulfuro inter e intracatenarios, de modo que las cuatro cadenas se enlazan de forma covalente entre sí. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio de la cadena pesada variable o dominio variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), con lo que una región bisagra flexible se localiza entre el primer y el segundo dominio constante. La cadena pesada de un anticuerpo se puede asignar a de uno de cinco tipos, llamados IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de su secuencia y estructura de dominio ("clase" de un anticuerpo). Varios de estos se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. De forma similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio de la cadena ligera variable o dominio variable de la cadena ligera, seguido de un dominio de la cadena ligera constante

(CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Por ejemplo, los anticuerpos solo de cadena pesada (anticuerpos VHH) natural (camélidos, es decir, de *Camelidae*, suborden *Tylopoda*, que incluye camellos, dromedarios y llamas) no comprenden un dominio CH1 clásico como el hallado en cadenas pesadas de IgG convencionales, y, por tanto, se expresan como dominios VHH fusionados directamente a los dominios bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo. Las secuencias de la región variable de los anticuerpos VHH derivados de llama, por ejemplo, son similares a las secuencias de la familia VH3 humana de dominios variables (Schroeder *et al.*, Int. Immunol. 2 (1989) 41-50). En comparación con los anticuerpos del tipo IgG, la secuencia de aminoácidos del dominio CDR3 en dominios VHH de L. llama es más larga en promedio que la mayoría de los dominios CDR3 de los anticuerpos de tipo IgG clásicos que comprenden cadenas pesadas y ligeras. Al igual que los anticuerpos IgG clásicos, la posición de las CDR en los anticuerpos VHH se puede determinar por procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.637.677). Los residuos 11, 37, 44, 45 y 47 son importantes para la formación de la interfase de la cadena (véase, por ejemplo, el documento WO 99/42077).

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto (IgG/VHH = cuatro cadenas/dos cadenas) que comprende solo una porción de un anticuerpo intacto y que se une al mismo antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv), anticuerpos de dominio único y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "célula" incluye tanto células procariotas, que se usan para la propagación de plásmidos, como células eucariotas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico. En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO, opcionalmente una célula CHO K1 (por ejemplo, una ATCC CCL-61 o DSM ACC 110), o una célula CHO DG44 (también conocida como CHO-DHFR[-], por ejemplo, una célula DSM ACC 126), o una célula CHO XL99, una célula CHO-T (véase, por ejemplo, Morgan, D., *et al.*, Biochemistry 26 (1987) 2959-2963), o una célula CHO-S, o una célula Super-CHO (Pak, S.C.O., *et al.* Cytotechnol. 22 (1996) 139-146), o célula BHK, o una célula NS0, o una célula Sp2/0, o una célula HEK 293, o una célula HEK 293 EBNA, o una célula PER.C6® o una célula COS. Si estas células no se adaptan al crecimiento en medio sin suero o en suspensión, se puede realizar una adaptación previa al uso en el procedimiento actual. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula" incluye la célula objeto y su descendencia. Por tanto, las palabras "transformante" y "célula transformada" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias o subcultivos. También se entiende que toda la descendencia puede que no sea precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula transformada originalmente.

El término "clon" indica una población de linfocitos B que secretan anticuerpos y se dividen que surgen de/se originan a partir de un linfocito B individual. Por tanto, un clon de linfocito B es una población homogénea de linfocitos B y produce un anticuerpo monoclonal.

El término "par análogo de dominios variables de anticuerpo" indica un par de dominios variables de anticuerpo que se obtiene de un linfocito B que secreta anticuerpo individual (clon), es decir, que se ha generado como par durante la respuesta inmunitaria de un mamífero debido al contacto con una molécula inmunógena o que se ha ensamblado aleatoriamente durante un enfoque de presentación.

El término "animal de laboratorio" indica un animal no humano. En un modo de realización, el animal de laboratorio se selecciona de rata, ratón, hámster, conejo, camello, llama, primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollo, anfibios, tiburones y reptiles. En un modo de realización, el animal de laboratorio es un conejo.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos de transcripción y/o traducción y secreción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula se puede determinar en base a la cantidad de correspondiente ARNm que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia de interés se puede cuantificar por qPCR o RT-PCR o por hibridación Northern (véase Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico se pueden cuantificar por diversos procedimientos, por ejemplo, por ELISA, sometiendo a ensayo la actividad biológica del polipéptido, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como inmunoelectrotransferencia o radioinmunoensayo, usando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (véase Sambrook, *et al.*, (1989), *supra*).

Para un experto en la técnica son bien conocidos los procedimientos para convertir una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido, en una correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica esta secuencia de aminoácidos y viceversa. Por lo tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales y asimismo por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado de

este modo.

Un "casete de expresión" indica una construcción que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como promotor y sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

La expresión se puede realizar como expresión transitoria o bien como expresión estable. En general, los anticuerpos se secretan en el medio de cultivo por la célula que los produce. Por lo tanto, las cadenas de anticuerpos no maduros contienen una extensión N terminal (también conocida como secuencia señal), que es necesaria para el transporte/secreción del anticuerpo a través de la pared celular hacia el medio extracelular. En general, la secuencia señal para la producción recombinante de un anticuerpo se puede derivar de cualquier gen que codifique un polipéptido secretado. Si se usa una secuencia señal heteróloga, debe ser una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para la secreción en levadura, por ejemplo, la secuencia señal natural de un gen heterólogo que se va a expresar se puede sustituir por una secuencia señal de levadura homóloga derivada de un gen secretado, tal como la secuencia señal de invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Hansenula*, el segundo descrito en el documento US 5.010.182), la secuencia señal de fosfatasa ácida o la secuencia señal de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 0 362 179). En células de mamífero, la secuencia señal natural es satisfactoria, aunque otras secuencias señal de mamífero pueden ser adecuadas, tales como secuencias señal de otros polipéptidos secretados de la misma especie o relacionada así como secuencias señal de secreción vírica, por ejemplo, secuencia señal de glucoproteína D del herpes simple. El fragmento de ADN que codifica dicho presegmento se liga en el marco, es decir, se enlaza de forma funcional, al fragmento de ADN que codifica una cadena de anticuerpo.

El término "maquinaria de expresión" indica la suma de las enzimas, cofactores, etc. de una célula que está implicada en las etapas de la expresión génica comenzando con la etapa de transcripción de un ácido nucleico o gen (es decir, también llamado "maquinaria de expresión génica") a la modificación postraduccional del polipéptido codificado por el ácido nucleico. El mecanismo de expresión, por ejemplo, comprende las etapas de transcripción de ADN en pre-ARNm, corte y empalme de pre-ARNm en ARNm maduro, traducción en un polipéptido del ARNm y modificación postraduccional del polipéptido.

Un "plásmido de expresión" o "vector de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) comprendido(s) en una célula huésped. Típicamente, un plásmido/vector de expresión comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariota y uno o más casetes de expresión para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) de interés comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural, opcionalmente un finalizador de la transcripción y una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que se "enlaza de forma funcional al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central se enlazan de forma funcional si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

El término "mezcla alimentadora" indica una combinación de diferentes aditivos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/u otras proteínas que promueven la activación y/o la supervivencia de los linfocitos B y/o la secreción de anticuerpos. La mezcla alimentadora puede ser una mezcla alimentadora natural, por ejemplo, obtenida del sobrenadante de cultivo de timocitos (TSN), que es una combinación no definida de citocinas. De forma alternativa, la mezcla alimentadora puede ser una mezcla alimentadora sintética, que es una combinación definida de diferentes aditivos producidos de forma recombinante o sintetizados químicamente, tales como factores de crecimiento, citoquinas y/u otras proteínas que promueven la activación y/o supervivencia de linfocitos B y/o secreción de anticuerpos.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" o "transfectantes" y "células transformadas" y "células transfectadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un "individuo" o "sujeto" es un vertebrado. En un modo de realización, el vertebrado es un mamífero. Los

mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano. En otros modos de realización, el individuo o sujeto es un conejo.

El término "marcaje" indica un proceso para determinar la presencia o ausencia de un marcador de superficie, que se puede determinar por la unión/no unión de un anticuerpo anti-marcador de superficie que se une específicamente y marcado a una célula. Por tanto, la presencia de un marcador de superficie se determina, por ejemplo, en el caso de un marcador de fluorescencia por la aparición de una fluorescencia, mientras que la ausencia de un marcador de superficie se determina por la ausencia de fluorescencia después de la incubación de una célula o una población de células con el respectivo anticuerpo anti-marcador de superficie que se une específicamente y marcado.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos producidos por un clon de célula individual, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades pequeñas. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un determinante individual en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo pero sin limitarse a procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Los términos "ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" indican una molécula polimérica que consiste en nucleótidos individuales (también llamados bases) a, c, g y t (o u en ARN), por ejemplo, ADN, ARN o modificaciones de los mismos. Esta molécula polinucleotídica puede ser una molécula polinucleotídica natural o una molécula polinucleotídica sintética o una combinación de una o más moléculas polinucleotídicas naturales con una o más moléculas polinucleotídicas sintéticas. También se engloban por esta definición las moléculas polinucleotídicas naturales en las que uno o más nucleótidos se cambian (por ejemplo, por mutagénesis), se delecionan o se añaden. Un ácido nucleico se puede aislar o bien integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un casete de expresión, un plásmido/vector o el cromosoma de una célula huésped. Un ácido nucleico se caracteriza asimismo por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales.

"Enlazado de forma funcional" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador se enlazan de forma funcional a una secuencia codificante si este actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia enlazada. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que se "enlazan de forma funcional" son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas tales como un líder secretor y un polipéptido, son contiguas y en marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor enlazado de forma funcional se localiza, en general, hacia 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo a ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si el potenciador incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores enlazados de forma funcional se pueden localizar hacia 5', dentro o hacia 3' de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si se localiza en el extremo hacia 3' de la secuencia codificante de modo que la transcripción avanza a través de la secuencia codificante en la secuencia de poliadenilación. Un codón de parada de la traducción se enlaza de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico exónico si se localiza en el extremo hacia 3' (extremo 3') de la secuencia codificante de modo que la traducción avanza a través de la secuencia codificante hasta el codón de parada y allí finaliza. El enlace se logra por procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Un "gen estructural" indica la región de un gen sin una secuencia señal, es decir, la región codificante.

El término "unión específica" y equivalentes gramaticales del mismo indican que el anticuerpo se une a su diana con una constante de disociación (KD) de 10^{-7} M o menos, en un modo de realización de desde 10^{-8} M a 10^{-13} M, en otro modo de realización de desde 10^{-9} M a 10^{-13} M. El término se usa además para indicar que el anticuerpo no se une específicamente a otras biomoléculas presentes, es decir, se une a otras biomoléculas con una constante de disociación (KD) de 10^{-6} M o más, en un modo de realización de 10^{-6} M a 1 M.

Un "vector/plásmido de transfección" es un ácido nucleico (también indicado como molécula de ácido nucleico) que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del en el vector/plásmido de transfección que comprende ácidos nucleicos codificantes/gen(es) estructural(es) en una célula huésped. Un vector/plásmido de transfección comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, por ejemplo, para *E. coli*, que, a su vez, comprende un origen de replicación procariota, y un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariota comprende además el plásmido/vector de transfección, uno o más ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección eucariota, y uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés. Los ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección y el/los ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) un polipéptido de interés se colocan cada uno dentro de un casete de expresión, con lo que cada casete de expresión comprende un promotor, un ácido nucleico codificante y un finalizador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que se "enlaza de forma funcional al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central se enlazan de forma funcional si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a la región de la cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen en general estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman y Co., N.Y. (2007), página 91). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (véanse, por ejemplo, Portolano, S., *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "animal joven" indica un animal antes de que se produzca la madurez sexual. Un hámster joven, por ejemplo, es de una edad de menos de 6 semanas, especialmente menos de 4 semanas. Un ratón joven, por ejemplo, es de una edad de menos de 8 semanas, especialmente menos de 5 semanas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que la densidad celular del cultivo del que se toman las células alimentadoras EL4-B5 que se usan en un cocultivo con linfocitos B tiene influencia sobre la frecuencia (es decir, número relativo) de clones de linfocitos B obtenidos en el cocultivo de linfocitos B y células alimentadoras EL4-B5 que secretan un anticuerpo específico de antígeno. Este hallazgo es sorprendente ya que la técnica enseña que no se debe exceder una densidad celular máxima de células EL4-B5 de 1.000.000 células/ml en cultivos únicos de EL4-B5. Se ha descubierto que este no es el caso y que se pueden usar densidades celulares incluso mayores lo que permite una producción más eficaz de las células EL4-B5, es decir, se reduce el número de cultivos ya que se puede usar una densidad celular mayor sin cambiar el número de células EL4-B5 empleadas en el cocultivo.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que en general la frecuencia de unión a antígeno y pocillos positivos para IgG entre todos los pocillos positivos para IgG se incrementa cuando las células EL4-B5 usadas en el cocultivo se han obtenido de un cultivo con densidades celulares de EL4-B5 mayores que las publicadas en el momento de la obtención de las células EL4-B5 que se emplean. Este efecto se observó hasta una densidad celular de 1.500.000 células/ml.

Inmunización

Para la generación de anticuerpos terapéuticos, se inmuniza un animal no humano con la diana terapéutica (sola o bien en combinación con un estímulo inmunógeno) para provocar una respuesta inmunitaria o se usan enfoques sintéticos, tales como colecciones de presentación en fagos. Si se usa un animal transgénico (es decir, que tiene un sistema inmunitario humano) o una colección de presentación en fagos humanos, se obtienen anticuerpos humanos. De otro modo, se obtienen anticuerpos de animales no humanos que serán humanizados después de esto. Una rara posibilidad de obtener anticuerpos terapéuticos potenciales es de la sangre de un ser humano que se ha recuperado de una enfermedad.

A menudo se usan animales no humanos, tales como ratones, conejos, hámsters y ratas, como modelo animal para evaluar tratamientos basados en anticuerpos. Por lo tanto, normalmente se requiere proporcionar anticuerpos con reactividad cruzada que se unen al antígeno de animal no humano así como al antígeno humano.

En el procedimiento como se informa en el presente documento, se pueden usar linfocitos B obtenidos de cualquier fuente, por ejemplo, ser humano, ratón, hámster o conejo. Dependiendo de la fuente del linfocito B, se ajusta/elige la mezcla alimentadora.

En el caso de un linfocito B de conejo, la célula alimentadora es una célula EL4-B5. En un modo de realización el conejo se selecciona de conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW), conejos Zimmermann (ZIKA), conejos de cepa mutante Alicia, conejos de cepa mutante basilea, conejos transgénicos con un locus de inmunoglobulina humana, conejos con *rb1gM* inactivado y cruces de los mismos.

En el caso de un linfocito B humano, la célula alimentadora es una célula EL4-B5.

En el caso de un linfocito B murino, la célula alimentadora es una célula EL4-B5. En un modo de realización, el ratón es un ratón NMRI o un ratón balb/c.

En el caso de un linfocito B de hámster, la célula alimentadora es una célula EL4-B5. En un modo de realización, el hámster se selecciona de hámster armenio (*Cricetulus migratorius*), hámster chino (*Cricetulus griseus*) y hámster sirio (*Mesocricetulus auratus*). En un modo de realización preferente, el hámster es el hámster armenio.

Fuente y aislamiento de linfocitos B

La sangre proporciona una alta diversidad de linfocitos B productores de anticuerpos. Los clones de linfocitos B obtenidos a partir de ellos secretan anticuerpos que casi no tienen secuencias de aminoácidos idénticas o superpuestas dentro de las CDR, por tanto muestran una alta diversidad.

En un modo de realización, los linfocitos B, por ejemplo, de la sangre, se obtienen de desde 4 días después de la inmunización hasta como máximo 14 días después de la inmunización o el refuerzo más reciente del animal no humano. Este intervalo de tiempo permite una gran flexibilidad en el procedimiento como se informa en el presente documento. En este intervalo de tiempo es probable que los linfocitos B proporcionen la migración de los anticuerpos más afines desde el bazo a la sangre (véanse, por ejemplo, Paus, D., *et al.*, JEM 203 (2006) 1081-1091; Smith, K.G.S., *et al.*, The EMBO J. 16 (1997) 2996-3006; Wrammert, J., *et al.*, Nature 453 (2008) 667-672).

Los linfocitos B de la sangre, por ejemplo, de un animal no humano o de sangre humana, se pueden obtener con cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede usar la centrifugación con gradiente de densidad (DGC) o lisis de eritrocitos (lisis). La centrifugación por gradiente de densidad en comparación con la lisis hipotónica proporciona un mayor rendimiento global, es decir, número de clones de linfocitos B. Adicionalmente de las células obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad, un gran número de células se divide y crece en la etapa de cocultivo. También es mayor la concentración de anticuerpo secretado en comparación con las células obtenidas con un procedimiento diferente. Por lo tanto, en un modo de realización la proporción de una población de linfocitos B es por centrifugación por gradiente de densidad.

De forma alternativa, los linfocitos B se pueden obtener del bazo u otros órganos inmunológicos secundarios como los ganglios linfáticos o las placas de Peyer.

ETAPAS de selección previas al cocultivo

Los linfocitos B que producen anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno se pueden enriquecer a partir de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC). Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento la población de linfocitos B se enriquece a partir de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC).

En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento los PBMC son deficitarios en macrófagos. Esto es especialmente ventajoso para los linfocitos B de origen de conejo para la etapa de cocultivo.

Los macrófagos se pueden disminuir de los PBMC por adhesión a la superficie de la placa de cultivo celular (véase la etapa de preincubación).

Incubar la población de linfocitos B en medio de cocultivo antes del depósito de células individuales puede incrementar el número total de células secretoras de anticuerpos obtenidas después del depósito de células individuales en comparación con un depósito de células individuales directamente después del aislamiento y enriquecimiento opcional de la población de linfocitos B de la sangre de un animal no humano (en un modo de realización, el animal no humano es un conejo). Específicamente, la incubación es a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente una hora en medio EL4-B5, por ejemplo, usando una estufa de incubación de cultivo celular.

En un modo de realización de los procedimientos como se informa en el presente documento las células son de un animal inmunizado con proteínas y son deficitarias en macrófagos antes del marcaje.

Las células que no producen un anticuerpo que se une a antígeno o, asimismo, las células que producen un

anticuerpo que se une al antígeno se pueden reducir o enriquecer, respectivamente, usando un enfoque de fijación. Allí, el respectivo antígeno se presenta unido a una superficie y las células que se unen a la misma se enriquecen selectivamente en la población celular en caso de que las células unidas se procesen adicionalmente, o se reducen en la población celular en caso de que las células que quedan en solución se procesen adicionalmente.

El procedimiento como se informa en el presente documento comprende en un modo de realización antes del depósito de células individuales una etapa de selección en la que linfocitos B que producen anticuerpos específicos y/o sin reactividad cruzada se seleccionan en base a marcadores de superficie celular y separación/sincronización celular activada por fluorescencia. En un modo de realización los linfocitos B maduros se separan/enriquecen/seleccionan. Para la selección de linfocitos B de diferentes especies animales no humanas se pueden usar diferentes marcadores de superficie celular.

Con el marcaje de poblaciones celulares no diana y linfocitos que no se unen específicamente es posible disminuir selectivamente estas células. En esta etapa de disminución solo se puede lograr una disminución parcial. Aunque la disminución no es cuantitativa, reduce o incluso elimina el número de células interferentes en el posterior marcaje de fluorescencia de las células restantes. Por un depósito de células individuales de linfocitos B maduros (linfocitos B de memoria, plasmablastos madurados por afinidad y células plasmáticas) por separación celular activada por fluorescencia usando el marcaje, se puede obtener un mayor número de clones de células/pocillos IgG⁺ en la etapa de cocultivo.

Se pueden marcar diferentes poblaciones celulares usando diferentes marcadores de superficie tales como células CD3⁺ (linfocitos T), células CD19⁺ (linfocitos B), células IgM⁺ (linfocitos B indiferenciados maduros), células IgG⁺ (linfocitos B maduros), células CD38⁺ (por ejemplo, plasmablastos) y células IgG⁺CD38⁺ (preplasmocitos).

Está disponible el marcaje de inmunofluorescencia para la selección de linfocitos B IgG⁺ maduros, tales como linfocitos B de memoria, plasmablastos y células plasmáticas. Para una selección o enriquecimiento de linfocitos B las células se marcan de forma individual, se marcan de forma doble o bien se marcan de forma triple.

Tabla: **Marcaje de inmunofluorescencia para la determinación de linfocitos B maduros de ratón (A-J), hámster (Ik) y conejo (L-N).**

origen de linfocitos B	separación de linfocitos B con	fracción de todas las células viables (%)
ratón	IgG ⁺ CD19 ⁺	0,5 ± 0,2 n = 14
ratón	IgG ⁺ CD38 ⁺	0,8 ± 0,5 n = 9
ratón	IgG ⁺ CD138 ⁺	0,06 ± 0,07 n = 6
ratón	IgG ⁺ CD138 ⁺	0,6 ± 0,5 n = 6
ratón	IgG ⁺ CD27 ⁺	0,1 ± 0,1 n = 8
ratón	CD27 ⁺ CD138 ⁺	1,5 ± 0,5 n = 2
ratón	CD27 ⁺ IgG ⁺ CD3 ⁻	0,10 ± 0,04 n = 3
ratón	CD3 ⁻ CD27 ⁺	1,33 n = 1
ratón	IgG ⁺ CD268 ⁺	0,8 n = 1
ratón	CD38 ⁺ CD3 ⁻	12 ± 7 n = 2
hámster	IgG ⁺ IgM ⁺	0,6 ± 0,1 n = 15
conejo	IgG ⁺	0,6 ± 0,2, n = 5
conejo	IgG ⁺ IgM ⁺	0,4 ± 0,2, n = 2
conejo	IgG ⁺ CD138 ⁺	0,3 ± 0,1, n = 5

En un modo de realización los procedimientos comprenden la etapa de disminuir la población de linfocitos B de macrófagos y enriquecer los linfocitos B de la población de linfocitos B que secretan anticuerpo que se unen específicamente a un antígeno diana.

Depósito de células individuales

El procedimiento como se informa en el presente documento comprende la etapa de depositar los linfocitos B de una población de linfocitos B como células individuales. En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento el depósito como células individuales es por separación celular activada con fluorescencia (FACS). El marcador de superficie usado para el marcaje requerido para el depósito de células individuales de FACS puede ser con la combinación de marcador específico como se explica en el presente documento.

Una etapa de centrifugación adicional después del depósito de células individuales y antes del cocultivo puede incrementar el número de células secretoras de anticuerpos y la cantidad de IgG secretada.

En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento el

procedimiento comprende la etapa de centrifugar las células depositadas individuales antes del cocultivo. En un modo de realización preferente, la centrifugación es durante 5 min a 300 x g.

Cocultivo

Los linfocitos B depositados individuales se cocultivan con células alimentadoras EL4-B5 murinas en presencia de una mezcla alimentadora.

Como se explica anteriormente, se puede lograr un incremento en el rendimiento en la etapa de cocultivo (número de clones de células/pocillos IgG⁺ así como concentración de IgG) y también un enriquecimiento o aislamiento de linfocitos B IgG⁺ maduros de PBMC por marcaje de inmunofluorescencia adecuado.

El marcaje de inmunofluorescencia usado para linfocitos B obtenidos de la sangre de un animal no humano de laboratorio también se puede usar para el marcaje de linfocitos B obtenidos del bazo y otros órganos inmunológicos de un animal no humano de laboratorio, tal como ratón, hámster y conejo. Para linfocitos B derivados de sangre de conejo se halló un 0,2 % de células IgG⁺ después de la disminución de macrófagos. Las placas de Peyer de conejo mostraron un 0,4 % de células IgG⁺ y el bazo mostró un 0,3 % de células IgG⁺ después de la disminución de macrófagos.

Con los procedimientos como se informa en el presente documento después de aproximadamente siete (7) días, es decir, después de 5, 6, 7 u 8 días, especialmente después de 7 u 8 días, de cocultivo se pueden obtener concentraciones de anticuerpo de desde aproximadamente 30 ng/ml hasta 15 µg/ml o más (valor promedio de aproximadamente 500 ng/ml). Con la cantidad de anticuerpo proporcionada de este modo se puede llevar a cabo con más detalle un alto número de diferentes análisis para caracterizar el anticuerpo, por ejemplo, con respecto a la especificidad de unión. Con la caracterización mejorada del anticuerpo en esta fase temprana en el procedimiento de cribado/selección es posible reducir el número de reacciones de aislamiento y secuenciación de ácido nucleico que se tienen que realizar. Adicionalmente, el clon de linfocito B proporciona una cantidad de ARNm que codifica la región variable de la cadena ligera y pesada monoclonal, permitiendo el uso de un cebador de PCR degenerado y obvia el requerimiento de un cebador de alta especificidad. También se reduce el número requerido de ciclos de PCR. Por tanto, en un modo de realización la PCR con retrotranscriptasa es con un cebador de PCR degenerado para el dominio variable de la cadena ligera y pesada.

La etapa de cocultivo con células alimentadoras puede estar precedida y también seguida de un número de etapas adicionales.

En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento, la mezcla alimentadora es un sobrenadante de cultivo de timocitos. En un modo de realización específico, el sobrenadante de cultivo de timocitos se obtiene de los timocitos del timo del respectivo animal no humano.

Debido al origen de la mezcla alimentadora, que se deriva del sobrenadante de timocitos cultivados ("*thymocyte cultivation supernatant*" - TSN), se pueden producir variaciones de lote a lote considerables.

Para superar esta variabilidad, se puede emplear una mezcla alimentadora sintética que consiste en componentes sintéticos.

Una mezcla alimentadora sintética que consiste en IL-1β (interleucina-1 beta), TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-2 (interleucina-2) e IL-10 (interleucina-10) es conocida de Tucci, A., *et al.*, J. Immunol. 148 (1992) 2778-2784.

Los aditivos específicos de especies de linfocitos B para la mezcla alimentadora sintética pueden dar como resultado cantidades incrementadas de anticuerpos secretados por el respectivo clon de linfocito B. Las células altamente productoras simultáneamente contienen más ARNm que, a su vez, facilita la transcripción inversa y secuenciación del ácido nucleico codificante, por ejemplo con un conjunto de cebadores inespecíficos redundantes.

Con la adición de SAC (células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan, se usó un lote de SAC individual) se puede incrementar el número de linfocitos B que secretan anticuerpo y la concentración de IgG promedio en el sobrenadante después del cocultivo. Para la adición de SAC en el cocultivo, se puede definir un intervalo de concentración como reducido así como las concentraciones incrementadas de SAC reducen la cantidad de anticuerpo secretado.

En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento, la mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B murinos comprende IL-1β, IL-2, IL-10, TNF-α y BAFF. En un modo de realización, se añade BAFF a una concentración de 5 ng/ml.

En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento, la mezcla

alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de hámster comprende IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , IL-6 y SAC. En un modo de realización, se añade IL-6 a una concentración de 10 ng/ml. En un modo de realización, se añade SAC en una proporción de 1:75.000.

5 En presencia de células alimentadoras EL4-B5, se requieren al menos IL-1 β y TNF α para el cocultivo de linfocitos B de ratón, hámster y conejo. Se pueden omitir IL-2 e IL-10 para el cocultivo de células murinas. Se pueden cultivar linfocitos B de hámster en ausencia de IL-2 o bien IL-10. Se pueden cultivar linfocitos B de conejo en ausencia de IL-2 o IL-10 o bien IL-6.

10 En un modo de realización, IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-10 e IL-21 son IL-1 β murina recombinante, TNF- α murino, IL-2 murina, IL-10 murina e IL-21 murina.

En un modo de realización, se añade BAFF a una concentración de 5 ng/ml.

15 En un modo de realización, se añade IL-6 a una concentración de 10 ng/ml.

En un modo de realización, se añade SAC en una proporción de 1:75.000.

20 El cocultivo es en un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento, en placas multipocillo de poliestireno con pocillos con un fondo redondo. El volumen de trabajo de los pozos es en un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento de 50 μ l a 250 μ l. En un modo de realización los pocillos se recubren al menos parcialmente con un sustrato no fibroso preparado de una combinación de resina plástica polimérica y moléculas anfipáticas, en la que la molécula anfipática comprende un resto hidrófilo y una región hidrófoba, en la que las regiones hidrófobas se anclan dentro del sustrato y los restos hidrófilos se exponen en el sustrato. En un modo de realización las moléculas anfipáticas se seleccionan de alquilamina etoxilada, poli(etilenimina), octildecamina o mezclas de las mismas (véase, por ejemplo, el documento EP 1 860 181).

Caracterización de células cocultivadas

30 Para la determinación (cualitativa y cuantitativa) de IgG secretada después del cocultivo se pueden usar en general todos los procedimientos conocidos para un experto en la técnica tales como un ELISA. En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento se usa un ELISA.

35 Dependiendo de los resultados de caracterización se puede obtener un clon de linfocito B, es decir seleccionar. El término "clon" indica una población de linfocitos B que secretan anticuerpos y se dividen que surgen de/se originan a partir de un linfocito B individual. Por tanto, un clon de linfocito B produce un anticuerpo monoclonal.

Aislamiento de ARNm, clonación y secuenciación

40 A partir de los linfocitos B el ARNm total se puede aislar y transcribir en ADNc. Con cebadores específicos se puede amplificar el ácido nucleico que codifica la región VH y VL análoga. Casi no se obtienen secuencias idénticas. El procedimiento proporciona anticuerpos altamente diversos que se unen al mismo antígeno.

45 Los cebadores usados para la amplificación del ácido nucleico que codifica VH se pueden usar para ADNc obtenido de células del ratón NMRI, el hámster armenio, el ratón Balb/c así como el hámster sirio y el conejo.

50 En un modo de realización de todos los procedimientos como se informa en el presente documento, la secuencia de aminoácidos se deriva del ácido nucleico que codifica VH amplificado y el punto inicial y final exactos se identifica localizando las secuencias de aminoácidos de EVQL/QVQL (SEQ ID NO: 40 y 41) a VSS (región VH) (SEQ ID NO: 42) y de DIVM/DIQM (SEQ ID NO: 43 y 44) a KLEIK (región VL) (SEQ ID NO: 45).

En el presente documento también se informa de un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

55 a) proporcionar una población de linfocitos B (maduros) (obtenidos de la sangre de un animal no humano de laboratorio),

60 b) teñir las células de la población de linfocitos B con al menos un tinte de fluorescencia (en un modo de realización con de uno a cuatro, o de dos a cuatro tintes de fluorescencia),

c) depositar células individuales de la población teñida de linfocitos B en recipientes individuales (en un modo de realización el recipiente es un pocillo de una placa multipocillo),

65 d) cultivar los linfocitos B individuales depositados en presencia de células alimentadoras y una mezcla alimentadora (en un modo de realización las células alimentadoras son células EL4-B5, en un modo de realización

la mezcla alimentadora es TSN natural, en un modo de realización la mezcla alimentadora es una mezcla alimentadora sintética),

e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B individuales,

f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpos que se unen específicamente por una PCR con retrotranscriptasa y secuenciación de nucleótidos, y de este modo obtener un ácido nucleico que codifica el dominio de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpo monoclonal,

g) introducir el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,

h) introducir el ácido nucleico en una célula,

i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo de la célula o del sobrenadante de cultivo celular y de este modo producir un anticuerpo.

En un modo de realización, el animal no humano se selecciona de rata, ratón, hámster, conejo, primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollo, anfibios y reptiles.

El procedimiento como se informa en el presente documento

La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que es ventajoso el uso de células alimentadoras EL4-B5 en el cocultivo con linfocitos B que se han obtenido de un cultivo de células EL4-B5 que tiene una densidad celular (final) de más de 1.000.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para cocultivar uno o más linfocitos B que comprende la etapa de

- incubar el uno o más linfocitos B con células EL4-B5,

con lo que las células EL4-B5 se han obtenido/son de un cultivo de células EL4-B5 que tiene una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

En un modo de realización, el cultivo de células EL4-B5 tiene una densidad celular de 1.400.000 células/ml hasta 1.500.000 células/ml.

El procedimiento se ejemplifica a continuación con dos preparaciones de linfocitos B que expresan anticuerpos con diferente especificidad de unión.

En el primer ejemplo, que no se engloba en las reivindicaciones y está presente solo con propósitos ilustrativos, se usaron linfocitos B obtenidos de un conejo que se había inmunizado con CDCP1 humano.

Los linfocitos B obtenidos del conejo inmunizado se depositaron como células individuales en los pocillos de una placa multipocillo (para cada tres placas de 96 pocillos; 252 pocillos por cada densidad celular de EL4-B5). Cada célula depositada individual se cocultivó con 50.000 células EL4-B5 irradiadas con 50 Gy en presencia de TSN y SAC durante 7 días.

La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG, es decir, los pocillos en los que se pudo detectar IgG en el sobrenadante de cocultivo, fue comparable independientemente de la densidad celular del cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	285	435	535	655	775
Pocillos positivos para IgG por placa [%]	49,6	42,4	39,7	38,9	42,1

También la productividad promedio fue comparable independientemente de la densidad celular del cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	285	435	535	655	775
concentración de IgG promedio por placa [µg/ml]	1,2	1,0	1,1	1,5	0,9

- 5 La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno, es decir, los pocillos en los que se produjo IgG que se une específicamente al antígeno diana, de los pocillos totales fue comparable solo para las densidades de células bajas y altas del cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	285	435	535	655	775
pocillos de IgG específica de antígeno por placa [% pocillos totales]	24,6	13,5	15,9	25,4	28,6

- 10 La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno, es decir, los pocillos en los que se produjo IgG que se une específicamente al antígeno diana, de los pocillos positivos para IgG fue comparable solo para las densidades celulares altas del cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla y la figura 1).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	285	435	535	655	775
pocillos de IgG específica de antígeno por placa [% pocillos positivos para IgG]	51,5	32,6	39,2	65,6	68,6

- 20 En el segundo ejemplo, se usaron linfocitos B obtenidos de un conejo que se había inmunizado con seroalbúmina humana.

- 25 Los linfocitos B obtenidos del conejo inmunizado se depositaron como células individuales en los pocillos de una placa multipocillo (para cada dos placas de 96 pocillos; 168 pocillos por cada densidad celular de EL4-B5). Cada célula depositada individual se cocultivó con 50.000 células EL4-B5 irradiadas con 50 Gy en presencia de TSN y SAC durante 7 días.

- 30 La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG, es decir, los pocillos en los que se pudo detectar IgG en el sobrenadante de cocultivo, fue comparable hasta una densidad celular de 1.450.000 células/ml en el cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	295	510	700	1100	1450	1710	2275
Pocillos positivos para IgG por placa [%]	70,3	61,3	65,5	67,3	53,0	38,1	55,4

- 35 También la productividad promedio fue comparable hasta una densidad celular de 1.450.000 células/ml en el cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	295	510	700	1100	1450	1710	2275
concentración de IgG promedio por placa [µg/ml]	4,8	4,1	4,4	3,9	3,8	2,3	2,1

- 40 La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno, es decir, los pocillos en los que se produjo IgG que se une específicamente al antígeno diana, de los pocillos totales fue comparable hasta una densidad celular de 1.450.000 células/ml en el cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véase la siguiente tabla).

Tabla

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	295	510	700	1100	1450	1710	2275
pocillos de IgG específica de antígeno por placa [% pocillos totales]	23,8	20,3	26,2	23,2	21,5	8,4	7,8

- 5 La frecuencia promedio de pocillos positivos para IgG específica de antígeno, es decir, los pocillos en los que se produjo IgG que se une específicamente al antígeno diana, de los pocillos positivos para IgG se incrementó a densidades celulares de aproximadamente 700.000 células/ml y de aproximadamente 1.450.000 células/ml en el cultivo del que se tomaron las células EL4-B5 (véanse la siguiente tabla y la figura 2).

Tabla

10

Densidad celular de cultivo de EL4-B5 [x1000/ml]	295	510	700	1100	1450	1710	2275
pocillos de IgG específica de antígeno por placa [% pocillos positivos para IgG]	35,0	33,2	40,0	34,5	40,2	21,6	14,7

Los siguientes ejemplos y secuencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, de la que su verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

15

Ejemplos**Materiales y procedimientos****20 Técnicas de ADN recombinante**

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25

Medios y tampones

El tampón de bloqueo para ELISA comprende 1X PBS y BSA al 1 %.

- 30 El tampón de recubrimiento para ELISA comprende 4,29 g de Na₂CO₃* 10 H₂O y 2,93 g de NaHCO₃; añadir agua hasta un volumen final de 1 litro, pH 9,6 ajustado con HCl 2 N.

La solución de etanol para aislamiento de ARN comprende etanol al 70 % o etanol al 80 %.

- 35 El tampón FACS para tinción de inmunofluorescencia comprende 1X PBS y BSA al 0,1 %.

El tampón IMDM para ELISA comprende 1X PBS, IMDM al 5 % y BSA al 0,5 %.

El tampón de incubación 1 para ELISA comprende 1X PBS, CroteinC al 0,5 %.

40

El tampón de incubación 2 para ELISA comprende 1X PBS, CroteinC al 0,5 % y Tween 20 al 0,02 %.

El tampón de incubación 3 para ELISA comprende 1X PBS, BSA al 0,1%.

- 45 El tampón de incubación 4 para ELISA comprende 1X PBS, BSA al 0,5 %, Tween al 0,05 %, PBS (10X), KH₂PO₄ 0,01 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, pH 7,0.

El tampón PCR comprende KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 9,0.

- 50 El tampón de lavado 1 para ELISA comprende 1X PBS, Tween 20 al 0,05 %.

El tampón de lavado 2 para ELISA comprende 1X PBS, Tween 20 al 0,1 %.

El tampón de lavado 3 para ELISA comprende agua, NaCl al 0,9 %, Tween 20 al 0,05 %.

55

El medio EL4-B5 comprende RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con FCS al 10 %

(Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomicina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y β -mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia).

5 Cuidado animal e inmunización

Los animales de laboratorio se mantuvieron de acuerdo con la legislación de protección animal alemana (TierSCHG) así como de acuerdo con las respectivas directrices europeas.

10 El antígeno se aplicó en primer lugar junto con adyuvante de Freud completo (CFA). Otras aplicaciones fueron con adyuvante de Freud incompleto (IFA). La emulsión que contiene antígeno se aplicó por vía subcutánea con lo que la emulsión comprendió de desde 50 a 100 pg de antígeno dependiendo del peso del animal de laboratorio receptor.

15 Se usaron conejos NZW (Charles River Laboratories International, Inc.) para inmunización. Se disolvió el antígeno en tampón de K_3PO_4 pH 7,0 a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló (1:1) con adyuvante de Freud completo (CFA) hasta la generación de emulsión estable. Los conejos recibieron una inyección intradérmica (i.d.) de 2 ml de emulsión seguida de una segunda inyección intramuscular (i.m.) y una tercera subcutánea (s.c.), cada una de 1 ml, en un intervalo de una semana. La cuarta inyección i.m. de 1 ml se realizó dos semanas después, seguida de otras
20 dos inyecciones s.c. de 1 ml en un intervalo de cuatro semanas.

Durante la inmunización se determinó el valor de anticuerpo sérico con un ensayo específico de antígeno. A un valor de anticuerpo con una CI_{50} de 1:10000, se obtuvo la sangre o el bazo del animal inmunizado. Para la reactivación de linfocitos B específicos de antígeno, se aplicaron de 30 μ g a 50 μ g del antígeno por vía intravenosa al animal de laboratorio tres días antes de la extracción de la sangre o del bazo.
25

Retirada de órganos, sangre y macrófagos

30 Se obtuvo sangre de ratones y hámsters por punción de la vena retrobulbérica. Se obtuvo sangre de conejos por punción de la vena de la oreja o, para volúmenes más grandes, de la arteria de la oreja. Se recogió sangre completa (10 ml) de conejos 4-6 días después de la tercera, cuarta, quinta y sexta inmunización y se usó para separación celular individual por FACS.

35 Se aislaron macrófagos de la sangre obtenida por unión al plástico de cultivo celular. Para ratones y hámsters, se pueden obtener aproximadamente 3×10^5 macrófagos de cada animal por este procedimiento.

Si se requirió una cantidad más grande de macrófagos de ratón o hámster, se aislaron macrófagos peritoneales. Para esto los animales tienen que ser de al menos 3 meses de edad. Para la retirada de macrófagos peritoneales, se sacrificaron los animales y se inyectaron de inmediato 5 ml de medio EL4-B5 con una temperatura de 37 °C en la cavidad peritoneal. Después de masajear el vientre del animal durante 5 minutos, se retiró la solución que contenía las células.
40

La sangre completa que contiene EDTA se diluyó dos veces con 1xPBS antes de la centrifugación de densidad en Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories) o Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, cat. n.º 17-1440-03), que se realizó para aislar PBMC de conejo. Se lavaron los PBMC dos veces antes de la tinción con anticuerpos.
45

Centrifugación por gradiente de densidad

50 El aislamiento de leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) se llevó a cabo por separación por gradiente de densidad con Lympholyte® de acuerdo con las instrucciones del fabricante A (Lympholyte®-mammal, Cedarlane).

Se diluyó sangre extraída a 2:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un vial de centrifuga se proporcionó el mismo volumen de medio de separación por densidad y la sangre diluida se añadió cuidadosamente por medio de la pared del vial. El vial se centrifugó durante 20 min a 800 x g sin frenado. Los linfocitos se obtuvieron de la capa provisional blanca. Las células retiradas se complementaron con 10 ml de PBS y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió, se lavó y se centrifugó. El sedimento final se resuspendió en PBS.
55

60 Lisis hipotónica de eritrocitos

Para la destrucción de eritrocitos por lisis hipotónica se diluyó una solución de cloruro de amonio (BD Lyse™) a 1:10 con agua y se añadió en una proporción de 1:16 a sangre completa. Para la lisis de eritrocitos se incubó la mezcla durante 15 minutos en la oscuridad. Para la separación de los residuos celulares de células intactas se centrifugó la solución durante 10 min a 800 x g. El sobrenadante se desechó, se resuspendió el sedimento en PBS, se lavó de nuevo, se centrifugó y se resuspendió el sedimento en PBS. Ejemplo 8
65

Disminución de macrófagos

Se usaron placas de 6 pocillos estériles (calidad para cultivo celular) para disminuir macrófagos y monocitos a través de adhesión inespecífica. Se recubrieron los pocillos con KLH (hemocianina de lapa californiana) o bien con estreptavidina y los péptidos de control. Cada pocillo se rellenó con de 3 ml a (como máximo) 4 ml de medio y hasta 6×10^6 leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica del conejo inmunizado y se dejó que se unieran durante de 60 a 90 min a 37 °C en la estufa de incubación. Después de esto, se transfirió el sobrenadante que contiene linfocitos a un vial de centrifugación y se centrifugó a 800 x g durante 10 min. El sedimento se resuspendió en PBS.

Enriquecimiento de linfocitos B específicos de antígeno

El respectivo antígeno se diluyó con tampón de recubrimiento hasta una concentración final de 2 µg/ml. Se añadieron 3 ml de esta solución al pocillo de una placa multipocillo de 6 pocillos y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Antes del uso se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos dos veces con PBS. La solución de linfocitos B se ajustó hasta una densidad celular de 2×10^6 células/ml y se añadieron 3 ml a cada pocillo (hasta 6×10^6 células por 3-4 ml de medio) de una placa multipocillo de 6 pocillos. Se incubó la placa durante de 60 a 90 min a 37 °C. Se retiró el sobrenadante y se retiraron las células no adherentes lavando cuidadosamente los pocillos 1-4 veces con 1xPBS. Para la recuperación de los linfocitos B específicos de antígeno adherentes se añadió 1 ml de una solución de tripsina/EDTA a los pocillos de la placa multipocillo y se incubó durante de 10 a 15 min a 37 °C. Se detuvo la incubación por adición de medio y se transfirió el sobrenadante a un vial de centrifugación. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se combinaron los sobrenadantes con los otros sobrenadantes. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 10 min a 800 x g. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción de inmunofluorescencia. El sedimento se resuspendió opcionalmente en PBS.

Cocultivo de linfocitos B y células EL4-B5

a) Se realizó el cocultivo en placas multipocillo de 96 pocillos con fondo redondo. Se preparó una solución base que comprende células EL4-B5 ($1,6 \times 10^6$ células/15,2 ml) y citoquinas en medio EL4-B5. Se añadieron 200 µl de la solución base a cada pocillo de la placa multipocillo. A cada pocillo se añadió un linfocito B individual por separación celular activada por fluorescencia. Después de la adición de los linfocitos B se centrifugó la placa durante 5 minutos a 300 x g. La placa se incubó durante siete días a 37 °C.

b) Se cultivaron linfocitos B separados individuales en placas de 96 pocillos con 210 µl/pocillo de medio EL4-B5 con células Pansorbin (1:20000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % y células de timoma murino EL4-B5 irradiadas con radiación gamma (2×10^4 /pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en la estufa de incubación. Se retiraron los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B para el cribado y se obtuvieron las células de inmediato para la clonación génica de la región variable o congelación a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

Se cultivaron linfocitos B humanos en consecuencia.

Cultivo de linfocitos T

Se aislaron los linfocitos T del timo de ratones y hámsters de 3-4 semanas de edad o de conejos de 4-5 semanas de edad, respectivamente. Se centrifugaron las células y se cultivaron o congelaron de inmediato en alícuotas de 3×10^7 células. Se sembraron los timocitos con una densidad celular mínima de 5×10^5 células/ml de medio EL4-B5 en matraces de cultivo de 175 cm² y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

Cultivo de macrófagos

Se aislaron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones y hámsters, respectivamente, de una edad de al menos tres meses. Se cultivaron macrófagos peritoneales de ratones y hámsters, o leucocitos monomorfonucleares en la sangre de conejos en medio EL4-B5 a una densidad celular de al menos 1×10^5 células/ml en matraces de cultivo de 175 cm² durante 1,5 horas a 37 °C. Después, se retiró el medio y se retiraron células no unidas de los macrófagos unidos por lavado con medio EL4-B5 caliente, seguido de cultivo durante 48 horas en 35 ml de medio.

Cocultivo de linfocitos T y macrófagos

Se cultivaron linfocitos T y macrófagos durante 48 horas en matraces separados. Antes de combinar ambas poblaciones celulares, se centrifugaron los linfocitos T durante 10 min a 800 x g. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de medio. Se ajustaron los linfocitos T a una densidad celular mínima de 5×10^5 células/ml y se añadieron 10 pg de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y 5 ng o 50 ng de fitohemaglutinina M (PHA-M) por ml de medio. Se retiró el medio de cultivo de los macrófagos y se añadió la suspensión de linfocitos T a los matraces que contenían macrófagos. Después de 36 horas de cocultivo se retiró el medio de cultivo y se

denominó solución TSN. Para la retirada de las células restantes se filtró la solución TSN a través de un filtro de 0,22 µm. Se congeló la solución TSN a - 80 °C en alícuotas de 4 ml.

Tinción de inmunofluorescencia

Protocolo 1:

Dependiendo del número de células que se van a teñir, se proporcionaron las células en 100 µl de medio (menos de 10⁶ células) o 200 µl de medio (más de 10⁶ células), respectivamente. El anticuerpo marcado fluorescente se diluyó con suero al 5 % del animal de laboratorio y tampón FACS hasta un volumen final de 100 µl o 200 µl, respectivamente. Se incubó la mezcla de reacción en un soporte de rodillos durante 40 min a 4 °C en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces a 300 x g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 400 µl de PBS y se filtró a través de un tamiz de 70 µm. La solución filtrada se transfirió a un vial de FACS y directamente antes del experimento de FACS, se tiñeron las células muertas por adición de yoduro de propidio (6,25 µg/ml). Si se marcó el anticuerpo marcado con biotina, el anticuerpo se detectó en una segunda etapa con Alexa Flour(R) 647 marcado con estreptavidina (anticuerpo 197).

Protocolo 2:

El anticuerpo anti-IgG de conejo con FITC usado para la separación celular individual fue de AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Alemania).

Para tinción de superficie, se incubaron las células con el anticuerpo anti-IgG de conejo con FITC óptimamente diluido en PBS durante 30 min con balanceo a 4 °C en la oscuridad. Después de la centrifugación, se retiraron los sobrenadantes por aspiración. Los PBMC se sometieron a dos ciclos de centrifugación y lavado con PBS helado. Finalmente, se resuspendieron los PBMC en PBS helada y se sometieron de inmediato a los análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis FACS para discriminar entre células muertas y vivas. En otros experimentos, las células teñidas se depositaron individualmente por FACS.

Se usaron un Becton Dickinson FACSAria equipado con un ordenador y el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) para recopilar y analizar los datos.

Ensayos de proliferación

a) Ensayo de viabilidad Cell Titer Glo (CTG)

Se usó el ensayo de viabilidad CTG (Promega; n.º G7571) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

b) Ensayo con ³H-timidina

Después de 6 días de incubación, se añadió ³H-timidina (0,5 µCi/pocillo) y se incubó durante otras 16 horas. La incorporación de ³H-timidina durante la proliferación celular se determinó con un contador de centelleo de microplaca (Wallac).

c) Análisis microscópico

Para la adquisición de imágenes microscópicas, se usó un microscopio de contraste de fase de Leica (Leica DM IL) combinado con una cámara de alta resolución (Leica DFC290 HD).

d) Análisis de la activación de linfocitos B por medio de marcaje con CFSE.

Se lavaron los linfocitos B aislados con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). Se resuspendieron hasta 1x10⁷ células en 1 ml de PBS sin proteínas y se incubaron con CFSE (n.º C34554, Invitrogen/Molecular Probes) durante de 3 a 10 minutos a una concentración final de 2,5 µM a 37 °C. La carga de CFSE se detuvo por la adición de un exceso de medio complementado con FCS. Después del lavado extenso con medio que contenía FCS, los linfocitos B se usaron en experimentos de cocultivo. La proliferación de células (B) seleccionadas con CD19⁺ como consecuencia de la dilución de CFSE se confirmó por análisis de citometría de flujo (canal FL-1) después de los puntos temporales indicados.

Cuantificación de IgG

La placa multipocillo de 96 pocillos en la que se realizó el cocultivo se centrifugó después de siete días de cocultivo a 300 x g durante 5 min. Se retiraron 150 µl de sobrenadante y se diluyeron en una proporción de 2:1 con PBS en una segunda placa multipocillo de 96 pocillos.

El anticuerpo se usó a una concentración de 50 ng/ml. Si la DO fue de o excedió 1 después de un tiempo de incubación de 5 min, se sometió a prueba una serie de dilución de 0,8 a 108 ng/ml de IgG.

Detección de IgG específica de antígeno

Se pueden caracterizar anticuerpos producidos por linfocitos B depositados y cocultivados individuales o de linfocitos B obtenidos de un animal de laboratorio inmunizado con respecto a la unión a antígeno específica. Se realizó el ELISA a temperatura ambiente y se incubó la solución de ELISA entre las etapas individuales en un agitador a 20 x g. En la primera etapa el antígeno se unió a los pocillos de una placa multipocillo de 96 pocillos. Si el antígeno fue una proteína este se había diluido en tampón de recubrimiento y se aplicó directamente a la placa. Se unieron antígenos peptídicos por medio de la unión específica al par biotina/estreptavidina. Los pocillos de la placa multipocillo pueden estar ya recubiertos con CroteinC (CrC) soluble por el fabricante. Si no, se incubaron los pocillos después de la inmovilización del antígeno con 200 µl de tampón de bloqueo. Después de la incubación con 100 µl de solución de antígeno por pocillo (placa multipocillo prerrecubierta) o 200 µl de tampón de bloqueo, respectivamente, se retiró el antígeno no unido o el tampón de bloqueo lavando con tampón de lavado. Se añadieron sobrenadantes de linfocitos B diluidos en un volumen de 100 µl por pocillo y se incubaron. Después de la incubación se lavaron los pocillos. Después, se añadió el anticuerpo de detección en un volumen de 100 µl por pocillo. El anticuerpo se puede conjugar con peroxidasa de rábano picante o bien marcarse con biotina. El anticuerpo de detección se determinó con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación, se lavó la placa multipocillo y después se añadieron 50 µl de una solución de sustrato que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) por pocillo y se incubó durante el período como se da en la tabla X. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico y se determinó la densidad óptica a 450 nm y 680 nm con un fotómetro (Rainbow Thermo ELISA Reader) y el programa informático Xread plus.

Aislamiento de ácido ribonucleico (ARN)

Las células de las que se tenía que aislar el ARN se sedimentaron en primer lugar por centrifugación. El sedimento celular se lisó por la adición de 100 µl de tampón RLT con 10 µl/ml de beta-mercaptoetanol. Se resuspendieron las células por mezclado múltiple con una pipeta. Se transfirió la solución a un pocillo de una placa multipocillo. Se agitó brevemente la placa a 200 x g y se congeló a -20 °C.

Se realizó el aislamiento del ARN con el kit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

Protocolo 1:

Se llevó a cabo la transcripción inversa en un volumen de 20 µl. Para cada reacción se realizó un control con y sin retrotranscriptasa. Por reacción, se premezclaron 1 µl de dNTP (cada uno a 10 mM), 0,4 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,2 µg) y 0,6 µl de hexámero aleatorio (0,03 µg) y se añadieron a 8,5 µl de ARN en H₂O. Se incubó la mezcla de reacción durante 5 min a 65 °C y después se transfirió directamente a hielo. Después de esto, se premezclaron 2 µl de tampón RT (10 x), 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de DTT (0,1 M) y 1 µl de RNase Out™ (40 unidades) y se añadieron a la mezcla de reacción helada. Después de un tiempo de incubación de 2 min a temperatura ambiente se añadieron 0,5 µl de retrotranscriptasa Superscript™ II (25 unidades). Se incubó la mezcla de reacción durante 10 min a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la traducción durante 50 min a 42 °C. Después de la traducción se inactivó la retrotranscriptasa por incubación durante 15 min a 70 °C. El ADNc se almacenó a -20 °C.

Protocolo 2:

Se generó ADNc por transcripción inversa de ARNm usando Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En una primera etapa, se mezclaron 6 µl del ARNm aislado con 1 µl de tampón de hibridación y 1 µl (50 µM) de oligo dT, se incubaron durante 5 minutos a 65 °C y después de esto se colocaron de inmediato en hielo durante aproximadamente 1 minuto. Posteriormente, todavía en hielo, se añadieron 10 µl de 2x First-Strand Reaction Mix y SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix. Después de mezclar, se incubó la reacción durante 50 minutos a 50 °C. Se finalizó la reacción por incubación a 85 °C durante 5 minutos. Después de la finalización, se colocó la mezcla de reacción en hielo.

Reacción en cadena de la polimerasa

Protocolo 1:

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con el kit TaqPCR Core (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la PCR en un volumen de 20 µl. Se transfirieron las muestras al Mastercycler® a una temperatura de 95° C.

Protocolo 2:

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa usando AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificaron las regiones variables de la cadena ligera y cadena pesada en reacciones separadas. Se usaron cebadores de PCR (0,2 µM/reacción) con superposiciones de 25 pb para vectores de expresión de anticuerpos diana. Después de la PCR, se usaron 8 µl de la mezcla de reacción de PCR para el análisis en eGels de 48 pocillos (Invitrogen).

Secuenciación

Se determinaron las secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra realizada en SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

Análisis de secuencia de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencia

Se usó el paquete de programa informático de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), variante 10.2 y el paquete Vector NTI Advance, variante 8.0 de Infomax para la creación, mapeo, análisis, anotación e ilustración de secuencias.

Síntesis génica

Se prepararon segmentos de genes deseados que codifican ADNc por Geneart GmbH (Ratisbona, Alemania). Los segmentos génicos se flanquean por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares para facilitar la clonación de la construcción de expresión como se describe a continuación. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados por secuenciación de ADN.

Fijación en antígeno

a) Recubrimiento de placas

Biotina/estreptavidina: Se incubaron placas de 6 pocillos recubiertas con estreptavidina estériles (calidad de cultivo celular) con antígeno biotinilado a una concentración de 0,5 - 1(2) µg/ml en PBS a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes de su uso.

Proteína unida covalentemente: Se recubrieron placas de 6 pocillos de cultivo celular estéril con 2 µg/ml de proteína en tampón de carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, hidrogenocarbonato de disodio 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes de su uso.

b) Fijación de linfocitos B en antígeno

Se sembraron placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con el respectivo antígeno con hasta 6×10^6 células por 4 ml de medio y se dejó que se unieran durante una hora a 37 °C en la estufa de incubación. Se retiraron las células no adherentes lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con 1x PBS. Se desprendieron las células adherentes restantes por tripsina durante 10 min a 37 °C en la estufa de incubación y a continuación se lavaron dos veces en medio. Se mantuvieron las células en hielo hasta la tinción con inmunofluorescencia.

Preparación de plásmido-ADN

El ADN de plásmido que se va a usar como receptor para la clonación de los productos de PCR que codifican los dominios variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpo se linealizó en primer lugar por digestión con enzimas de restricción. Posteriormente, el ADN de plásmido linealizado se purificó por electroforesis en agarosa preparativa y se extrajo del gel (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen). Este ADN de plásmido purificado se añadió a un protocolo de PCR como molde usando superposición de cebadores (en 20-25 pb) con los productos de PCR que se van a clonar. La PCR se llevó a cabo usando AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen).

Clonación

Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión usando un procedimiento de "clonación independiente de sitio y ligación" (SLIC) que se describió por Haun, R.S., *et al.* (BioTechniques 13 (1992) 515-518) y Li, M.Z., *et al.* (Nature Methods 4 (2007) 251-256). Se trataron tanto el inserto como el vector purificado con 0,5 U de ADN polimerasa T4 (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania) por 1 µg de ADN durante 45 minutos a 25 °C en ausencia de dNTP para generar salientes coincidentes. La reacción se detuvo añadiendo 1/10 del volumen de reacción de una solución de dCTP 10 mM (Invitrogen). Los fragmentos de ADN del inserto y el vector tratado con T4 se combinaron con una proporción plásmido:inserto de 1:2 (p/p) (por ejemplo, 100 ng:200 ng) y se recombinaron añadiendo RecAProtein (New England Biolabs) y 10x tampón RecA durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se usaron 5 µl de cada uno de los plásmidos de expresión de la cadena pesada y cadena ligera

generados para transformar células de *E.coli* químicamente competentes MultiShot Strip Well TOP 10 (Invitrogen) usando un protocolo de transformación química estándar. Después de la regeneración (agitación durante 45 minutos a 37 °C de las células de *E. coli* transformadas), se transfirió la mezcla de transformación completa a DWP 96 (placas de pocillos profundos) que contenían 2 ml de medio LB complementado con ampicilina por pocillo. Las células se incubaron en un agitador durante 20 horas a 37 °C. En la siguiente etapa, el ADN de plásmido que codifica las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se purificó usando el NucleoSpin 96 Plasmid Mini Kit (Macherey&Nagel), se digirió con enzimas de restricción seleccionadas y se analizó en eGels de 48 pocillos (Invitrogen). Paralelamente, se prepararon reservas de glicerol para almacenamiento.

10 Transfección y expresión de anticuerpos recombinantes en células eucariotas

Se cultivaron células HEK293 con agitación a 120 rpm en medio F17 (Gibco) a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 8 %. Se dividieron las células el día antes de la transfección y se sembraron a una densidad de 0,7-0,8 x 10⁶ células/ml. El día de la transfección, se transfectaron 1-1,5 x 10⁶ células HEK293 en un volumen de 2 ml con 0,5 µg de plásmido HC más 0,5 µg de plásmido LC, suspendidos en 1 µl de medio sin 293 (Novagen) y 80 µl de medio OptiMEM® (Gibco) en placas de pocillos profundos de 48 pocillos. Se incubaron los cultivos durante 7 días a 180 rpm a 37 °C y CO₂ al 8 %. Después de 7 días, se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo, se filtraron y se analizaron para determinar el contenido de anticuerpos y la especificidad.

20 Cebador

a) Cebador para PCR de linfocitos B de linfocitos B que expresan anticuerpos de conejo

conjunto de cebadores 1:

cebador LC

- rb-V-kappa-HindIII (SEQ ID NO: 01):

GATTAAGCTTATGGACAYGAGGGCCCCCACTC

- rb-C-kappa-NheI (SEQ ID NO: 02):

GATCGCTAGCCCTGGCAGGCGTCTCRCTCTAACAG

cebador HC

- rb-CH1rev-1 (SEQ ID NO: 03):

GCAGGGGGCCAGTGGGAAGACTG

- rbVH3-23for3 (SEQ ID NO: 04):

CACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC

conjunto de cebadores 2:

cebador LC

- rb-V-kappa-Slic-s001 (SEQ ID NO: 06):

AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC

- rbCkI-rev2 (SEQ ID NO: 07):

CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

cebador HC

- rb-VH3-23-Slic-s001 (SEQ ID NO: 08):

AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC

- rb-CHlrev-2 (SEQ ID NO: 09):

CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG

5 cebador para amplificación de la cadena principal del plásmido de expresión de la cadena pesada:

- 8001-Slic-s001 (SEQ ID NO: 10):

TGGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGG

10

- 8001-Slic-as002 (SEQ ID NO: 11):

GCCCAGTCTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTGTGTTTCAGTGCTG

15 cebador para amplificación de la cadena principal del plásmido de expresión de la cadena ligera kappa:

- 8011-Slic-s001 (SEQ ID NO: 12):

GTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTG

20

- 8000-Slic-as002 (SEQ ID NO: 13):

CCCTCRTGTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTGTGTTTCAGTGCTG

25 b) Cebador para PCR de linfocitos B de linfocitos B de conejo que expresan anticuerpos humanos (derivados de conejo transgénico)

cebador para amplificación de dominios variables de la cadena pesada

30 HC-Up

- rb-VH3-23-Slic-s001 (SEQ ID NO: 08):

AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC

35

- bcPCR-huCgamma-rev (SEQ ID NO: 05):

CCCCCAGAGGTGCTCTTGGA

40 cebador para amplificación de dominios variables de la cadena ligera

- bcPCR-FHLC-leader-fw (SEQ ID NO: 06):

ATGGACATGAGGGTCCCCGC

45

- bcPCR-huCkappa-rev (SEQ ID NO: 07):

GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

50 c) Cebador para la amplificación de la cadena principal del plásmido de la cadena pesada:

- bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-as (SEQ ID NO: 08):

CAGCCCAGTCTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTGTGTTTCAGTGCTG

55

- bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-s (SEQ ID NO: 09):

CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG

60 d) Cebador para la amplificación de la cadena principal del plásmido de la cadena ligera kappa:

- bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-s (SEQ ID NO: 10):

GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC

5

- bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-as (SEQ ID NO: 11):

GCGGGGACCCTCATGTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTG

- 10 e) Cebador para PCR de linfocitos B de linfocitos B de donantes humanos

cebador para amplificación de dominios variables de la cadena pesada

- SLIC-hu-VHuniversal-for (SEQ ID NO: 12):

15

AGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAGGTGCAGCTGKTGSAG
TCTGS

- SLIC-hu-VH6-for (SEQ ID NO: 13):

AGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGGTRCAGCTGCAGSAG
TC

20

- hu-CH1gamma-rev (SEQ ID NO: 14):

GTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTT

25

Cebador para amplificación de dominios variables de la cadena ligera kappa

- SLIC-huVk2-for (SEQ ID NO: 15):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGATGTTGTGATGACTCAG
TCT

30

- SLIC-huVk3-for (SEQ ID NO: 16):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAAATTGTGWTGACRCA
GTCT

35

- SLIC-huVk5-for (SEQ ID NO: 17):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGACATCGTGATGACCCA
G

40

- SLIC-huVk7-for (SEQ ID NO: 18):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAAATTGTGCTGACTCA
GTCT

- SLIC-huVk8-for (SEQ ID NO: 19):

45

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAWRTTGTGMTGACKCA
GTCTCC

- SLIC-huVk1long-for (SEQ ID NO: 20):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGACATCCRGWTGACCCA
GTCT

- SLIC-huVk2longw-for (SEQ ID NO: 21):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGATRTTGTGATGACYCA
GWCT

- huCk-rev (SEQ ID NO: 22):

ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC

Cebador para amplificación de dominios variables de la cadena ligera lambda

- SLIC-huVI1-for (SEQ ID NO: 23):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGTCTGTGYTGACKCAG

- SLIC-huVI2-for (SEQ ID NO: 24):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGTCTGCCCTGACTCAG

- SLIC-huVI3-for (SEQ ID NO: 25):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCTCCTATGAGCTGAYWCAG

- SLIC-huVI4-for (SEQ ID NO: 26):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGCYTGTGCTGACTCAA

- SLIC-huVI5-for (SEQ ID NO: 27):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGSCTGTGCTGACTCAG

- SLIC-huVI6-for (SEQ ID NO: 28):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCAATTTTATGCTGACTCAG

- SLIC-huVI7-for (SEQ ID NO: 29):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGRCTGTGGTGACTCAG

- SLIC-huVI8-for (SEQ ID NO: 30):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGACTGTGGTGACCCAG

- SLIC-huVI9-for (SEQ ID NO: 31):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCWGCCTGTGCTGACTCAG

- SLIC-huVlambda10-for (SEQ ID NO: 32):

TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGGCAGGGCTGACTCAG

- huCl-1-rev (SEQ ID NO: 33):

TCTCCACGGTGCTCCCTTC

f) Cebador para amplificación del plásmido de expresión de inmunoglobulina humana

amplificación de la cadena principal del plásmido de expresión de la cadena pesada:

- hulg-PCR-vectorprimer-as (SEQ ID NO: 34):

GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA

- hulg-PCR-vectorprimer-VH-s (SEQ ID NO: 35):

AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC

amplificación de la cadena principal del plásmido de expresión de la cadena ligera kappa:

- hulg-PCR-vectorprimer-as kappa (SEQ ID NO: 36):

GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA

- hulg-PCR-vectorprimer-VK-s (SEQ ID NO: 37):

GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

amplificación de la cadena principal del plásmido de expresión de la cadena ligera lambda:

- hulg-PCR-vectorprimer-as lambda (SEQ ID NO: 38):

GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA

- hulg-PCR-vectorprimer-VL-s (SEQ ID NO: 39):

GAAGGGAGCACCGTGGAGA

Citocinas

Mezcla de Zubler: 2 ng/ml de IL-1 β de ratón, 50 ng/ml de IL-2 de ratón, 10 ng/ml de IL-10 de ratón y 2 ng/ml de TNF α de ratón (concentración final)

Citocinas sometidas a prueba para el establecimiento de una combinación de citocinas definida (dada como concentración final en caso de que no se establezca de otro modo):

citocina	concentración final	proveedor	n.º cat.
hulL-2	50 U/ml	Roche Dia. GmbH	11147528001
hulL-21	25 ng/ml	eBioscience	14-8219
mulL-21	100 ng/ml	R&Dsystems	594-ML
hulL-6	300 U/ml	Roche Dia. GmbH	11138600001
hulL-10	25 ng/ml	BD	554611
hulL-1 β	12,5 ng/ml	R&Dsystems	201-LB
hulL-33	100 ng/ml	Peptotech	200-33
TNF α	25 ng/ml	R&Dsystems	210-TA

Medio de linfocitos B de conejo

500 ml	RPMI 1640	n.º P04-17500	PAN Biotech
50 ml	FCS	n.º A15-512	PAA
5 ml	L-Gln	n.º 25030-024	Invitrogen
5 ml	piruvato de potasio	n.º P04-43100	PAN Biotech
5 ml	HEPES	n.º 15630-056	Invitrogen
500 μ l	β -mercaptoetanol	n.º 31350010	Invitrogen
1 ml	Pen/Strep	n.º 11074440001	Roche Dia. GmbH

Aditivos para el medio de linfocitos B de conejo

SAC	n.º 507858	Calbiochem
IL-21	n.º 14-8219	eBioscience
IL-2	n.º 1114752800	Roche

96er U-plate n.º 3799 Corning

5

Fenotipado/separación de anticuerpos

anticuerpo anti-Fc IgG de conejo caprino	AbDSerotec	STAR121F
anticuerpo de rata anti-CD138 de conejo	Roche GlycArt AG	
mAb anti-CD40 humano (clon Mab89)	Beckman Coulter	IM1374
anti-humano/murino (de conejo, con reacción cruzada)		
anticuerpo anti-CD40L:		
anticuerpo anti-muCD40L	R&D systems	AF1163
anticuerpo anti-huCD40L	&D systems	AF617 R
anticuerpo de burro anti-IgG de cabra Alexa 488	Molecular Probes	A11055

Varios

10

microesferas acopladas a anticuerpos anti-FITC Miltenyi Biotec	n.º 130-048-701
kit de aislamiento negativo de linfocitos B humanos	Invitrogen n.º 113.13D
Nucleofector Kit T	Lonza VCA-1002
CBA para IgG total	BD Biosciences n.º 558679

Ejemplo 1**Cultivo de células EL4-B5**

15

Las células EL4-B5 congeladas se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron con 10 ml de medio EL4-B5. Después de la centrifugación a 300 x g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de medio.

20

Las células EL4-B5 se inocularon a una densidad celular de 8 x 10⁴ células/ml en matraces de cultivo T175. Se determinó la densidad celular cada segundo día y se ajustó a 8 x 10⁴ células/ml. Las células tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 18 horas. Después, las células se sembraron con recuentos celulares de 3 x 10⁴ a 4 x 10⁵ células/ml hasta alcanzar diferentes densidades celulares finales.

25

Se obtuvieron las células y se ajustaron hasta una densidad celular de 1x10⁶ células/ml antes de la irradiación y a 50 Gy.

Ejemplo 2

30

Cocultivo de linfocitos B y células EL4-B5

Se cultivaron linfocitos B separados individuales en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL4-B5 con células Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % y células de timoma murino EL4-B5 irradiadas con radiación gamma (5 x 10⁴/pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en una estufa de incubación. Se retiraron los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B para el cribado y se obtuvieron las células de inmediato para la clonación génica de la región variable o congelación a - 80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

35

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> F. Hoffmann-La Roche AG	
5	<120> Procedimiento de cultivo de linfocitos B	
	<130> P33508-WO	
	<150> EP16162954	
10	<151> 30/03/2016	
	<160> 45	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador rb-V-kappa-HindIII	
	<400> 1	
25	gattaagctt atggacayga gggcccccac tc	32
	<210> 2	
	<211> 35	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador rb-C-kappa-NheI	
35	<400> 2	
	gatcgctagc cctggcaggc gtctcrtct aacag	35
40	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador rb-CH1rev-1	
	<400> 3	
50	gcagggggcc agtgggaaga ctg	23
	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador rbVH3-23for3	
60	<400> 4	
	caccatggag actgggctgc gctggcttc	29

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador bcPCR-huCgamma-rev
 <400> 5
 10
 cccccagagg tgctcttgga 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador bcPCR-FHLC-leader-fw
 20
 <400> 6
 atggacatga ggggtccccgc 20
 25
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador bcPCR-huCkappa-rev
 <400> 7
 35
 gatttcaact gctcatcaga tggc 24
 <210> 8
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-as
 45
 <400> 8
 cagcccagtc tccatggtgg caagcttcct ctgtgttcag tgctg 45
 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-s
 55
 <400> 9
 ctccaagagc acctctgggg gcacag 26
 60
 <210> 10

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-s
 <400> 10
 10 gccatctgat gagcagttga aatc 24
 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-as
 20 <400> 11
 gcgggggaccc tcatgtccat ggtggcaagc ttcctctg 38
 <210> 12
 25 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador SLIC-hu-VHuniversal-for
 <400> 12
 agcaacagct acaggtgtgc attccgaggt gcagctgktg sagtctgs 48
 35 <210> 13
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador SLIC-hu-VH6-for
 <400> 13
 45 agcaacagct acaggtgtgc attcccaggt rcagctgcag sagtc 45
 <210> 14
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador hu-CH1gamma-rev
 55 <400> 14
 gtccaccttg gtgttgctgg gctt 24
 60 <210> 15
 <211> 47
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador SLIC-huVk2-for	
5	<400> 15	
	tagcaacagc tacaggtgtg cattccgatg ttgtgatgac tcagtct	47
10	<210> 16	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador SLIC-huVk3-for	
	<400> 16	
20	tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaaa ttgtgwtgac rcagtct	47
	<210> 17	
	<211> 44	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador SLIC-huVk5-for	
30	<400> 17	
	tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaca tcgtgatgac ccag	44
35	<210> 18	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador SLIC-huVk7-for	
	<400> 18	
	tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaaa ttgtgctgac tcagtct	47
45	<210> 19	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador SLIC-huVk8-for	
	<400> 19	
55	tagcaacagc tacaggtgtg cattccgawr ttgtgmtgac kcagtctcc	49
	<210> 20	
	<211> 47	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
<223> cebador SLIC-huVk1long-for

5 <400> 20

tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaca tccrgwtgac ccagtct 47

10 <210> 21
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador SLIC-huVk2longw-for

<400> 21

tagcaacagc tacaggtgtg cattccgatr ttgtgatgac ycagwct 47

20 <210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador huCk-rev

<400> 22

30 **acactctccc ctgttgaagc tc** 22

35 <210> 23
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador SLIC-huVI1-for

<400> 23

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagt ctgtgytgac kcag 44

45 <210> 24
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador SLIC-huVI2-for

<400> 24

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagt ctgccctgac tcag 44

55 <210> 25
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cebador SLIC-huVI3-for
 <400> 25
 5
tagcaacagc tacaggtgtg cattctcct atgagctgay wcag 44
 <210> 26
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador SLIC-huVI4-for
 15 <400> 26
tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagc ytggtgac tcaa 44
 20 <210> 27
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador SLIC-huVI5-for
 <400> 27
 30 **tagcaacagc tacaggtgtg cattcccags ctgtgctgac tcag 44**
 <210> 28
 <211> 44
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador SLIC-huVI6-for
 40 <400> 28
tagcaacagc tacaggtgtg cattccaatt ttatgctgac tcag 44
 <210> 29
 45 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador SLIC-huVI7-for
 <400> 29
tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagr ctgtggtgac tcag 44
 55 <210> 30
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador SLIC-huVI8-for

<400> 30

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccaga ctgtggtgac ccag 44

5 <210> 31
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador SLIC-huVI9-for

15 <400> 31

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccaga ctgtggtgac ccag 44

20 <210> 32
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador SLIC-huVlambda10-for

<400> 32

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccwgc ctgtgctgac tcag 44

30 <210> 33
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cebador huCI-1-rev

<400> 33

40 tctccacggt gtcacctc 19

<210> 34
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> hulg-PCR-vectorprimer-as

50 <400> 34

ggaatgcaca cctgtagctg ttgcta 26

55 <210> 35
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> hulg-PCR-vectorprimer-VH-s

	<400> 35	
	aagcccagca acaccaaggt ggac	24
5	<210> 36 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> hulg-PCR-vectorprimer-as kappa	
15	<400> 36	
	ggaatgcaca cctgtagctg ttgcta	26
20	<210> 37 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> hulg-PCR-vectorprimer-VK-s	
	<400> 37	
	gagcttcaac aggggagagt gt	22
30	<210> 38 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> hulg-PCR-vectorprimer-as lambda	
	<400> 38	
40	ggaatgcaca cctgtagctg ttgcta	26
45	<210> 39 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> hulg-PCR-vectorprimer-VL-s	
50	<400> 39	
	gaagggagca ccgtggaga	19
55	<210> 40 <211> 4 <212> PRT <213> Homo sapiens	
60	<400> 40	

Glu Val Gln Leu

1

<210> 41

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gln Val Gln Leu

1

10

<210> 42

<211> 3

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 42

Val Ser Ser

1

20

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 43

Asp Ile Val Met

1

30

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 44

Asp Ile Gln Met

1

40

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 45

Lys Leu Glu Ile Lys

1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cocultivar uno o más linfocitos B que comprende las etapas de
- 5 - cultivar células EL4-B5 hasta una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml a 1.500.000 células/ml, e
- incubar el uno o más linfocitos B con una alícuota de 10^4 a 10^5 células EL4-B5 por linfocito B de las células EL4-B5 obtenidas en la etapa previa.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo de las células EL4-B5 es hasta una densidad celular de 1.400.000 células/ml a 1.500.000 células/ml.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la incubación es
- 15 adicionalmente en presencia de una mezcla alimentadora.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la mezcla alimentadora comprende uno o más de
- 20 i) interleucina-1 beta y factor de necrosis tumoral alfa,
- ii) interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-10 (IL-10),
- iii) células de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC),
- 25 iv) interleucina-21 (IL-21) y opcionalmente interleucina-2 (IL-2),
- v) factor de activación de linfocitos B de la familia del factor de necrosis tumoral (BAFF),
- 30 vi) interleucina-6 (IL-6),
- vii) interleucina-4 (IL-4), y
- viii) sobrenadante de cultivo de timocitos.
- 35 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la mezcla alimentadora comprende IL-1 β , TNF- α , IL-10 y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células EL4-B5 después del cultivo y antes de la incubación se irradian con radiación γ .
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento es para el cocultivo de un linfocito B.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que un linfocito B es un linfocito B depositado
- 45 individual.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la incubación es durante de 5 a 14 días.
- 50 10. Un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende las siguientes etapas
- a) proporcionar una población de linfocitos B maduros obtenidos de la sangre de un animal no humano de laboratorio,
- 55 b) teñir las células de la población de linfocitos B con al menos un tinte de fluorescencia,
- c) cultivar células EL4-B5 hasta una densidad celular de más de 1.000.000 células/ml a 1.500.000 células/ml,
- d) depositar células individuales de la población teñida de linfocitos B en recipientes individuales,
- 60 e) cultivar los linfocitos B individuales depositados en presencia de células alimentadoras y una mezcla alimentadora, en el que el linfocito B se incubaba con una alícuota de 10^4 a 10^5 células EL4-B5 por linfocito B de las células EL4-B5 obtenidas en la etapa c),
- 65 f) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B individuales,

- 5 g) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpos que se unen específicamente por una PCR con retrotranscriptasa y secuenciación de nucleótidos, y de este modo obtener un ácido nucleico que codifica el dominio de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpo monoclonal,
- h) introducir el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,
- 10 i) introducir el ácido nucleico en una célula,
- j) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo de la célula o del sobrenadante de cultivo celular y de este modo producir el anticuerpo.
- 15 11. Un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que
- a) el marcaje de los linfocitos B de una población de linfocitos B es con de uno a cuatro tintes fluorescentes,
- b) los linfocitos B se incuban opcionalmente en medio de cocultivo,
- 20 c) los linfocitos B depositados individuales se centrifugan opcionalmente con células alimentadoras precargadas, y
- d) el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y pesada variable de anticuerpo monoclonal se introduce en uno o más vectores de expresión para la expresión de un anticuerpo humano o
- 25 humanizado.

Figura 1

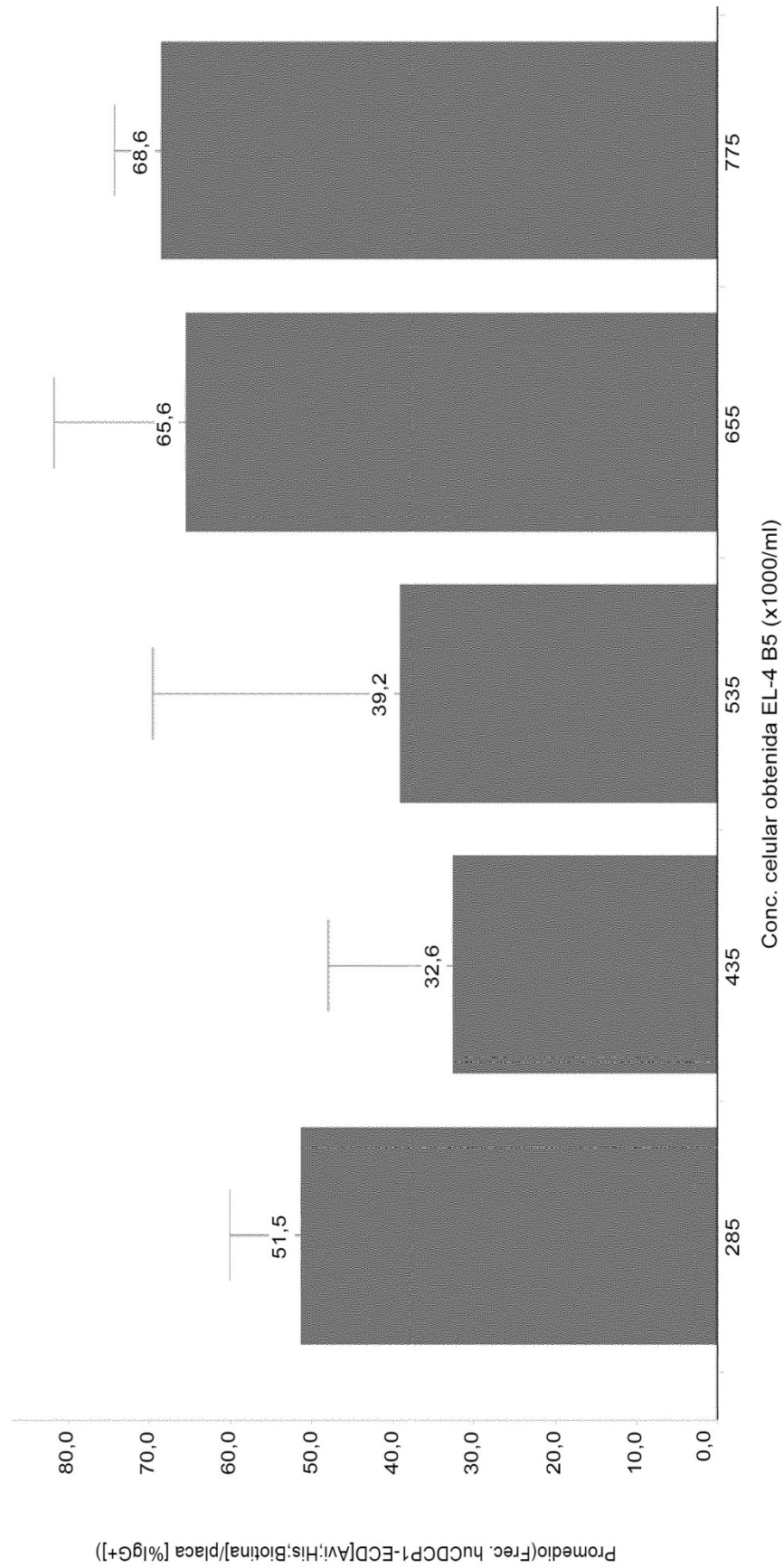


Figura 2

