



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 341 544**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04734554 .1**
⑨6 Fecha de presentación : **24.05.2004**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1633787**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

⑤4 Título: **Métodos para producir anticuerpos.**

③0 Prioridad: **30.05.2003 GB 0312481**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2010

⑦3 Titular/es: **UCB Pharma, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

⑦2 Inventor/es: **Lawson, Alastair David Griffiths y**
Lightwood, Daniel John

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Métodos para producir anticuerpos.

5 **Campo técnico**

El presente invento se refiere, en general, a métodos mejorados para producir anticuerpos de alta afinidad con una función deseada.

10 **Técnica fundamental**

La tecnología de hibridomas para el aislamiento de anticuerpos monoclonales se limita, en general, a la generación de mAbs de roedores y da lugar a la immortalización de sólo una pequeña fracción de las células formadoras de anticuerpos específicos, disponibles en un animal inmunizado. Por límites prácticos, los anticuerpos procedentes de bancos bacterianamente expresados están restringidos por el tamaño de los bancos y la necesidad de que el anticuerpo se pliegue y exprese apropiadamente en bacterias. Además, los anticuerpos generados por estos dos métodos requieren frecuentemente una potenciación de su afinidad para obtener anticuerpos con una afinidad suficientemente elevada para uso terapéutico. Se han diseñado diversos métodos alternativos para permitir que los anticuerpos de alta afinidad generados durante respuestas inmunes *in vivo* sean aislados de cualquier especie [Babcook *et al.* (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7843-7848; WO 92/02551; de Wildt *et al.* (1997), Journal of Immunological Methods 207: 61-67, y Catrin Simonsson Lagerkvist *et al.* (1995), BioTechniques 18 (5): 862-869].

El primer método alternativo que se diseñó fue el método del anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM; del inglés, selected lymphocyte antibody method), que permite que un único linfocito que está produciendo un anticuerpo con una especificidad deseada sea identificado dentro de una gran población de células linfoides y que la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo sea rescatada de ese linfocito. Las células productoras de anticuerpo que producen anticuerpos que se unen a antígenos seleccionados son detectadas utilizando un método adaptado del ensayo de placas hemolíticas (Jerne y Nordin, 1963, Science 140: 405). En este ensayo, se revisten eritrocitos con el antígeno seleccionado y se incuban con la población de células productoras de anticuerpo y una fuente de complemento. Las células individuales que producen anticuerpo son identificadas por la formación de placas hemolíticas. Las placas de eritrocitos lisados son identificadas usando un microscopio invertido, y la célula individual productora de anticuerpo de interés situada en el centro de la placa es separada utilizando técnicas de micromanipulación. Los genes de anticuerpo de la célula son clonados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) con transcripción inversa. El aislamiento físico de estas células limita el número de células B que pueden ser detectadas y aisladas. Como resultado, puede que muchos de los anticuerpos aislados aún requieran una potenciación de la afinidad ya que su afinidad puede estar solo en el intervalo nanomolar. Véase, por ejemplo, Babcook *et al.*, *supra*, donde se describe una afinidad de sólo 1,76 nanomolar ($1,76 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$).

En el ensayo de placas hemolíticas anteriormente descrito, los glóbulos rojos son típicamente revestidos con antígeno por medio de un sistema de copulación de biotina/estreptavidina que requiere que el antígeno esté biotinilado. Por lo tanto, este método está restringido a antígenos que están disponibles en forma pura y a aquellos que pueden ser biotinilados sin que se afecte la presentación epitópica. Evidentemente, este método no permite el aislamiento de anticuerpos contra ciertos tipos de antígenos. Por ejemplo, muchas proteínas son difíciles de purificar, particularmente las proteínas que se expresan en la superficie celular, tales como las proteínas de tipo III. Tras la biotinilación, muchas proteínas tienen alteradas su conformación y la presentación de epítopos deseables, tales como, por ejemplo, las proteínas que contienen grupos lisina en su sitio activo.

Puede resultar también deseable producir anticuerpos contra antígenos desconocidos, tales como proteínas expresadas en la superficie de células tales como células tumorales y células T activadas. Dado el requisito de que en el ensayo de placas se produzca lisis celular para que se puedan identificar las placas que contienen células productoras de anticuerpos, es difícil conseguir el uso directo de células tumorales en lugar de eritrocitos antigénicamente revestidos. La lisis celular depende del tipo celular, el antígeno y la concentración de anticuerpo. Los glóbulos rojos revestidos con el antígeno deseado se unirán a grandes cantidades del anticuerpo disponible y se lisarán fácilmente en presencia de complemento. Otros tipos celulares, tales como las células tumorales, no se lisarán tan fácilmente, especialmente cuando la disponibilidad de antígeno en la superficie puede ser muy baja y, por lo tanto, la unión del anticuerpo es baja.

En el método de de Wildt *et al.*, células B de pacientes aquejados de lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune en que los pacientes producen a menudo autoanticuerpos contra la proteína U1A, fueron sometidas a separación por inmuoafinidad utilizando placas de cultivo revestidas con U1A. Las células que no se unían a la proteína U1A eran eliminadas por lavado. Las células adherentes fueron luego recogidas de las placas utilizando un tratamiento con tripsina y fueron sometidas a separación celular individual utilizando un citómetro de flujo para seleccionar las células B individuales específicas para U1A. Las células B individuales fueron luego cultivadas en placas de 96 pocillos y clonalmente multiplicadas. Se ensayaron luego los sobrenadantes de los cultivos en cuanto a la producción de anticuerpos y se identificaron los clones de células B específicas para U1A. Luego se extrajo el RNA total de los pocillos positivos y se clonaron las regiones V_H/V_L de las células B.

En Catrin Simonsson Lagerkvist *et al.* (1995), se aislaron PBMCs que se unían al toxoide tetánico (TT), procedentes de pacientes inmunizados contra el tétanos, usando glóbulos magnéticos revestidos con TT. Se aislaron células B individuales específicas para TT utilizando una pipeta automática. Luego se sembraron 0,3 células B por pocillo en microplacas de 96 pocillos y se multiplicaron clonalmente. Luego se ensayaron los pocillos en cuanto a la presencia de anticuerpos específicos para TT. Luego se clonaron los genes de la región V de los anticuerpos de los pocillos positivos.

Tanto el método de de Wildt *et al.* como el de Catrin Simonsson Lagerkvist *et al.* requieren, antes de la multiplicación clonal, el aislamiento de células B individuales que reconocen el antígeno de interés, aislamiento que puede ser pesado y llevar mucho tiempo. Además, puesto que sólo se siembra una célula B o pocas células B en cada pocillo para microtitulación, se requiere un gran número de placas de microtitulación que deben ser exploradas para identificar las células B que reconocen específicamente el antígeno de interés.

En consecuencia, existe la necesidad de métodos menos laboriosos para el aislamiento de anticuerpos con una función deseada. Además, existe la necesidad de anticuerpos de mayor afinidad que no requieran una subsiguiente potenciación de la afinidad.

El presente invento proporciona un método para el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad con una función deseada.

Sumario del invento

De acuerdo con el presente invento, se proporciona un método para obtener un anticuerpo con una función deseada, método que comprende:

- a) poner una población de células B en contacto con una serie de recipientes unitarios a los que se ha unido un antígeno;
- b) separar de los recipientes unitarios aquellas células B que no se han unido al antígeno, mientras se conservan aquellas células B que se han unido al antígeno;
- c) cultivar una pluralidad de las células B unidas en aquellos recipientes unitarios en que han quedado retenidas, preferiblemente bajo unas condiciones adecuadas para multiplicación clonal;
- d) explorar el contenido de al menos un recipiente unitario para identificar por ello al menos un recipiente unitario positivo en cuanto a la presencia de células capaces de producir un anticuerpo con la función deseada; y
- e) obtener el anticuerpo deseado directa o indirectamente de dicho recipiente unitario.

Hay diversas ventajas proporcionadas por el presente invento.

Por ejemplo, sorprendentemente, el método permite el aislamiento directo de anticuerpos picomolares (o mejores) sin la necesidad de madurar posteriormente *in vitro* la afinidad de esos anticuerpos usando métodos tales como la mutagénesis, como es el caso de los anticuerpos derivados de fagos e hibridomas. El método del invento permite la identificación de números casi ilimitados de anticuerpos de afinidad excepcionalmente elevada con una función deseada. Estos anticuerpos de elevada afinidad tienen típicamente una afinidad en el intervalo picomolar, tales como aquellos con una afinidad inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 75 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM o inferior a 1 pM. El método del invento permite que se obtengan directamente uno o más de dichos anticuerpos, típicamente dos o más, lo que a juicio de los inventores no había sido conseguido antes.

El método del invento también permite la identificación de anticuerpos que se unen a cualquier antígeno, incluyendo antígenos desconocidos, antígenos de superficie celular y antígenos que no pueden ser biotinilados, sin que se altere la presentación de epítopos deseables. Como resultado, se pueden producir ahora anticuerpos con especificidades de unión que eran previamente inalcanzables mediante los ensayos convencionales de placas. El método del presente invento no requiere el aislamiento de células individuales productoras de anticuerpos antes de la clonación ni que las células se cultiven individualmente en recipientes unitarios separados. Como resultado, los anticuerpos pueden ser identificados más rápidamente ya que la duración de la siembra en placas y la exploración se reduce en comparación con el de diversos métodos de la técnica previa.

Descripción detallada del invento

Como aquí se utiliza, la expresión “ácido nucleico” incluye RNA (por ejemplo, mRNA) y DNA (por ejemplo, cDNA y DNA genómico). El DNA o RNA puede ser de cadena doble o de cadena sencilla. El DNA o RNA de cadena sencilla puede ser la cadena codificadora, también conocida como “cadena sentido”, o puede ser la cadena no codificadora, a la que también se hace referencia como “cadena antisentido”.

Como aquí se utiliza, el término “anticuerpo” incluye cualquier molécula inmunoglobulínica presente en la naturaleza o recombinante de cualquier clase de anticuerpo, tal como un miembro de la clase IgG, tal como, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y también cualquier fragmento inmunoglobulínico ligante de antígeno, tales como los fragmentos Fv, Fab, Fab’ y F(ab’)₂, y cualesquier derivados de los mismos, tales como fragmentos Fv de cadena sencilla.

5 Los anticuerpos recombinantes pueden tomar diversas formas diferentes e incluyen inmunoglobulinas completas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y fragmentos ligantes de antígeno tales como los fragmentos Fv, Fab, Fab’ y F(ab’)₂, y cualesquier derivados de los mismos, tales como fragmentos Fv de cadena sencilla. Los métodos para crear y fabricar estas moléculas de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Boss *et al.*, US 4.816.397; Cabilly *et al.*, US 6.331.415; Shrader *et al.*, WO 92/02551; Ward *et al.*, 1989, Nature 341: 544; Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 322: 323; Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423; Queen *et al.*, US 5.585.089; Adair, WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10: 1-142; y Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods 216: 165-181).

Como aquí se utiliza, el término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia conocida o desconocida que puede ser reconocida por un anticuerpo, incluyendo proteínas, glicoproteínas e hidratos de carbono. Preferiblemente, estos antígenos incluyen proteínas biológicamente activas, tales como hormonas, citocinas y sus receptores de la superficie celular, membranas celulares bacterianas o parasíticas o componentes purificados de las mismas, y antígenos víricos.

En un ejemplo, el antígeno está disponible en una forma pura obtenida sea por purificación directa a partir de la fuente nativa o sea por expresión recombinante y purificación de dicho antígeno.

En otro ejemplo, el antígeno es uno que es difícil de purificar. Dichos antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas expresadas en la superficie celular, tales como receptores, particularmente proteínas de tipo III.

En otro ejemplo, el antígeno es uno en que la presentación de epítopos deseables en el antígeno resulta alterada tras una biotinylación. Este incluye, pero no se limita a, proteínas que contienen lisinas en sus regiones de sitios activos.

En otro ejemplo, el antígeno se puede expresar en la superficie de una célula, sea natural o sea recombinantemente.

30 Dichas células pueden incluir, pero no se limitan a, células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, células T, células tumorales, células de levadura, células bacterianas, agentes infecciosos, parásitos, células vegetales, y células transfectadas tales como células NS0, CHO, COS y 293.

En un ejemplo, los antígenos expresados en la superficie de dichas células son antígenos que son difíciles de purificar o antígenos que pierden epítopos deseados tras una biotinylación, tales como los antígenos anteriormente descritos.

En otro ejemplo, el antígeno es desconocido y el antígeno es cualquier material que proporciona una fuente de posibles antígenos. Preferiblemente, ese material es de origen animal, por ejemplo, de mamífero, vegetal, levadura, bacteria o virus. El material puede ser una célula o una población de células para la cual sería deseable aislar anticuerpos, tales como células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, células T, células tumorales, células de levadura, células bacterianas, agentes infecciosos, parásitos y células vegetales. En una realización, la célula es una célula tumoral.

Como aquí se utiliza, la expresión “célula B” incluye cualquier célula B o derivado de la misma que produce un anticuerpo, tal como un linfocito B, una célula plasmática, un plasmoblasto, una célula B activada o una célula B de memoria. Estas células pueden secretar anticuerpos y/o mantener anticuerpos en la superficie de la célula.

La población de células B para uso en el presente invento será cualquier población de la que se sospecha que contiene al menos una célula B capaz de producir anticuerpos que tengan la función deseada.

Las células B para uso en el invento pueden ser obtenidas de diversas fuentes. Por ejemplo, se pueden obtener células B de un animal que haya sido inmunizado con un antígeno o que haya desarrollado una respuesta inmune hacia un antígeno como resultado de una enfermedad. Alternativamente, se pueden obtener células B, por ejemplo, de un animal naíf inmunizado que no ha estado previamente expuesto al antígeno de interés (o un animal del que no se sabe que haya estado expuesto al antígeno de interés o del que no se cree que haya estado expuesto al antígeno de interés).

Se pueden inmunizar animales con un antígeno seleccionado utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas en este campo técnico, adecuadas para generar una respuesta inmune [véase el Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (redactor), Volumen 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986]. Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas y cerdos, pueden ser inmunizados con objeto de obtener células B. Sin embargo, se prefieren generalmente los ratones, conejos, cerdos y ratas.

Se pueden encontrar números elevados de células B en el ganglio linfático y bazo periféricos del animal inmunizado, y, una vez que se ha generado una respuesta inmune y se ha sacrificado el animal, se extraen el bazo y los ganglios linfáticos. Utilizando técnicas bien conocidas en este campo técnico, se prepara una suspensión celular individual de células productoras de anticuerpos.

También se pueden obtener células B de un animal que ha generado las células durante el curso de una enfermedad. Por ejemplo, se pueden obtener células productoras de anticuerpos de un ser humano con una enfermedad de causa desconocida, tal como un cáncer, y se pueden utilizar para facilitar la identificación de anticuerpos que ejercen un efecto sobre el proceso morboso o que pueden conducir a la identificación de un agente o componente corporal que está implicado en la causa de la enfermedad. Similarmente, se pueden obtener células B de sujetos con una enfermedad de causa conocida, tal como la malaria o el sida. Estas células productoras de anticuerpos pueden proceder de la sangre o de ganglios linfáticos, así como de otros tejidos enfermos o normales.

Se pueden obtener también células B mediante técnicas de cultivo tales como la inmunización *in vitro*. C. R. Reading, en *Methods in Enzymology* 121: 18-33 [J. J. Langone y H. H. van Vunakis (redactores), Academic Press Inc., New York, EE.UU.], describe ejemplos de dichos métodos.

Como aquí se usa, la expresión “agente captor” incluye cualquier agente adecuado para captar células B y es preferiblemente cualquier proteína o péptido que se une a un anticuerpo. El agente captor es un antígeno como el anteriormente aquí definido, que está inmovilizado en un soporte. Los soportes particulares incluyen placas, por ejemplo, placas para microtitulación. Una vez que las células B y el agente captor han estado en contacto durante el tiempo apropiado para permitir la unión, las células no unidas pueden ser separadas y desechadas en la parte (b) del procedimiento.

Por “separar las células B captadas de las células B no captadas” queremos significar separar las células B que se unen al agente captor de aquellas que no se unen a él.

La separación puede ser llevada a cabo con la ayuda de una diversidad de técnicas que dependen de la naturaleza del agente captor, tal como mediante separación por inmunoafinidad (véase, por ejemplo, la Figura 10).

Se une el agente captor a una fase sólida (por ejemplo, una placa de microtitulación si se utiliza separación por inmunoafinidad, o glóbulos si se utilizan glóbulos) y se deja que las células B entren en contacto con la fase sólida durante el tiempo suficiente para permitir la unión. Las células B que no se unen a la fase sólida pueden ser luego separadas, quedando aquellas células B que están unidas a la fase sólida. El agente captor es un antígeno que está unido en forma purificada a la fase sólida. Alternativamente, el agente captor es una población homogénea o heterogénea de células para las que sería deseable aislar anticuerpos hacia al menos parte de los antígenos superficiales de la población. Alternativamente, el agente captor es una población de células transfectadas que expresan antígenos en su superficie.

Se une el agente captor a una fase sólida y se usa la separación por inmunoafinidad. En la separación por inmunoafinidad, una vez que las células productoras de anticuerpo han estado en contacto con el agente captor inmovilizado durante el tiempo suficiente para permitir la unión, la mezcla es lavada con un medio que facilita la separación de las células no adherentes del agente captor pero que deja las células que se unen al agente captor adheridas a la fase sólida a través del anticuerpo de la superficie de la célula B. Los medios adecuados serán conocidos por los expertos en la técnica o pueden ser fácilmente determinados empíricamente por los expertos en la técnica. Se puede utilizar cualquier medio de cultivo, tal como por ejemplo, el medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) o el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; del inglés, Dulbecco's modified Eagle medium). Preferiblemente, se emplean diversos lavados para eliminar las células no adherentes, por ejemplo, 10 o más lavados.

La separación por inmunoafinidad se lleva a cabo utilizando una serie de recipientes unitarios. Por un recipiente unitario se hace referencia a recipientes que son adecuados para contener pequeños volúmenes de líquido, por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación. Preferiblemente, cada uno de los recipientes unitarios tiene una capacidad de contención volúmica y/o un área superficial interna similares (por ejemplo, $\pm 10\%$) a las de un pocillo de una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos.

Preferiblemente, la separación por inmunoafinidad se lleva a cabo utilizando una placa de microtitulación. Por ejemplo, se pueden utilizar placas de microtitulación de 6, 24, 48, 96, 384 ó 1536 pocillos. Preferiblemente, cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación tiene unas dimensiones estándares. Preferiblemente, se usan placas de microtitulación de 96 pocillos que tienen pocillos de tamaño estándar.

Preferiblemente, en la operación de separación por inmunoafinidad, el agente captor saturará la superficie del recipiente unitario. Los expertos en la técnica serán capaces de ajustar fácilmente los parámetros de la operación de separación por inmunoafinidad, para optimizar el número de células B que son retenidas por el recipiente unitario (por ejemplo, el pocillo). Los parámetros que se pueden ajustar incluyen el volumen o el área superficial de los recipientes unitarios, la concentración o cantidad de agente captor unido a los pocillos, la concentración o cantidad de células B administradas a los pocillos, la fuente de las células B (por ejemplo, si las células B proceden de un individuo naíf o de baja respuesta, puede ser necesario entonces usar más células B), el número de lavados para separar las células no adherentes, y los medios utilizados para lavar los recipientes unitarios.

Cuando se seleccionan las células que producen un anticuerpo que se une al antígeno de interés, puede ser deseable asegurar que no se seleccionan células B que se unen inespecíficamente (por ejemplo, a la fase sólida, tal como las placas de microtitulación que se pueden utilizar en la separación por inmunoafinidad). En el caso de la separación por inmunoafinidad, esto puede ser llevado a cabo, por ejemplo, exponiendo primero las células B a placas de microtitu-

lación a las que no se ha unido un agente captor y desechando luego las células B que se unen inespecíficamente a los pocillos. Alternativamente, las células que se unen inespecíficamente podrían ser eliminadas después de la selección de las células que se unen al agente captor.

Una vez que las células que no se unen al agente captor son separadas, se cultiva una pluralidad de las células restantes (y, en una realización, todas las células restantes) en la operación (c) sin ser separadas en células individuales inmediatamente antes del cultivo. De esta manera, por contraste con la técnica previa, no es necesario que las células que se cultivan hayan sido individualmente aisladas. En realidad, la totalidad del método del primer aspecto del invento puede ser llevada a cabo sin aislar las células individuales que producen anticuerpos que se unen al agente captor.

La operación de separación es una separación por inmunoafinidad, y las células cultivadas se cultivan directamente después de la separación por inmunoafinidad.

Las células son cultivadas en una serie de recipientes unitarios. Cuando se ha utilizado separación por inmunoafinidad para separar las células que no se unen al agente captor, las células son cultivadas en los mismos recipientes unitarios en que fueron retenidas por la operación de separación por inmunoafinidad, en presencia de antígeno.

Cuando las células quedan retenidas en los recipientes unitarios (por ejemplo, como resultado de una separación por inmunoafinidad), se prefiere que, antes de la eliminación de las células que no se unen al agente captor [en la operación (a)], el número de células B/pocillo varíe de 100 a 20.000/pocillo. El número de células B dependerá del título sérico. Por ejemplo, un título sérico de 1/1000-1/10.000 requeriría cerca de 20.000 células B/pocillo, mientras que un título de 1/100.000-1/1.000.000 requeriría cerca de 100 células B/pocillo. Los expertos en la técnica serán capaces de ajustar fácilmente los parámetros de la operación de separación por inmunoafinidad (por ejemplo, el número y la intensidad de los lavados), para optimizar el número de células B que son retenidas por el recipiente unitario (por ejemplo, el pocillo).

Como se mencionó anteriormente, las células B no son separadas en células B individuales inmediatamente antes del cultivo.

Preferiblemente, en la operación (c), las células B son cultivadas durante entre 1 día y un mes, típicamente, aproximadamente, o al menos, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días o hasta un mes. Preferiblemente, las células B son cultivadas durante aproximadamente 5 a 10 días, más preferiblemente durante aproximadamente 6 a 9, o 6 a 8, días.

Preferiblemente, las células son cultivadas bajo unas condiciones adecuadas para la multiplicación clonal de las células B. La multiplicación clonal da lugar a una mayor cantidad de anticuerpo producido y mayores niveles de expresión de mRNA. La multiplicación clonal se lleva preferiblemente a cabo en presencia de un antígeno al que se une el anticuerpo con la función deseada, lo que puede facilitar el aislamiento de anticuerpos de mayor afinidad por medio de una maduración de afinidad *in vitro*.

Las condiciones adecuadas para la multiplicación clonal de células B son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Catrin Simonsson Lagerkvist *et al.*, *supra*). Las condiciones importantes incluyen el medio de cultivo, el tiempo durante el cual se cultivan las células, la temperatura y el CO₂ atmosférico.

Preferiblemente, las células B son cultivadas con células EL-4 irradiadas, en medios acondicionados de células T. Preferiblemente, las células B son cultivadas con células mutantes irradiadas de timoma EL-4 murino, EL-4/B5, junto con sobrenadante de células T/macrófagos humanos como fuente de factores de proliferación y diferenciación. Las células EL-4/B5 activan las células B a través de una interacción directa célula-célula no limitada por el MHC. La propia señal de activación no es mitogénica pero sensibiliza a las células B para que respondan a una (IL-2) o varias citocinas presentes en el sobrenadante de las células T humanas.

Una vez que las células han sido cultivadas, se puede explorar una pluralidad de las células cultivadas, en la operación (d) del procedimiento, para determinar la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que tenga la función deseada. Preferiblemente, esto implica explorar el sobrenadante de cultivo de dicha pluralidad de células cultivadas.

Cuando las células han sido cultivadas en una serie de recipientes unitarios, los recipientes unitarios pueden ser individualmente examinados (por ejemplo, tomando el sobrenadante de cultivo de los recipientes unitarios) en cuanto a la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que tenga la función deseada para, de este modo, identificar uno o más recipientes unitarios que sean positivos en cuanto a la presencia de células capaces de producir un anticuerpo que tenga la función deseada. De un recipiente unitario positivo se pueden obtener luego anticuerpos con la función deseada. Los anticuerpos pueden ser sintetizados directa o indirectamente a partir de las células presentes en el recipiente unitario en la operación (e) del método.

Se apreciará que el presente invento comprende cultivar conjuntamente células B genéticamente distintas (es decir, en el mismo recipiente), mientras que, en los métodos de la técnica previa, las células productoras de anticuerpos son individualmente aisladas y son luego separadamente cultivadas (es decir, lejos de células genéticamente distintas).

Sorprendentemente, se ha hallado que, cuando se cultivan conjuntamente células B genéticamente distintas de una población, normalmente sólo un ácido nucleico que codifica un anticuerpo está presente/es detectable (por ejemplo, por multiplicación; por ejemplo, por PCR) en el sobrenadante de cultivo de las células cultivadas al final del periodo de cultivo. En consecuencia, aunque en el presente invento se puede cultivar un número de células B en el mismo
 5 recipiente, no es generalmente necesario identificar ni aislar del recipiente una o más células B que sean capaces de producir anticuerpos con la función deseada; es decir, en general, las células B son clonales.

Como se mencionó anteriormente, en el presente invento no es necesario identificar ni aislar células B individuales de un recipiente unitario individual en el que se han cultivado células B. En consecuencia, el contenido de un recipiente
 10 unitario individual puede ser explorado en bloque. Por ejemplo, cada uno de los sobrenadantes de cultivo extraídos de una serie de recipientes unitarios individuales puede ser individualmente explorado, lo que permite la identificación de recipientes unitarios que son positivos en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos que tienen la función deseada. Preferiblemente, las células individuales que producen anticuerpos que tienen la función deseada no son identificadas ni aisladas de los recipientes unitarios. De este modo, en una realización del invento, la operación (d)
 15 del primer aspecto del invento no comprende el aislamiento de células individuales que producen anticuerpos con la función deseada.

Las operaciones (a) a (d) del primer aspecto del invento no comprenden el aislamiento de células individuales que producen anticuerpos con la función deseada.
 20

Los anticuerpos del invento pueden ser ensayados en cuanto a una función deseada mediante una diversidad de métodos. La función deseada puede ser meramente la unión a un antígeno de interés, o se pueden desear otras propiedades funcionales tales como, por ejemplo, propiedades de alta afinidad, antagonismo, agonismo o neutralización.

La unión a un antígeno deseado puede ser ensayada usando, por ejemplo, inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayo, ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay), inmunoensayos “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitinas, reacciones de precipitinas con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A, por citar unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (redactores), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, John Wiley & Sons, Inc., New, York, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad).
 25 30

Preferiblemente, se utiliza un ELISA para ensayar los anticuerpos que se unen a un antígeno deseado. Un protocolo de ELISA típico comprende preparar el antígeno, revestir el pocillo de una placa de microtitulación con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable, tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), al pocillo, e incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En los ELISAs, el anticuerpo de interés no ha de estar conjugado con un compuesto detectable; en vez de ello, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, se puede revestir el pocillo con el anticuerpo. En este caso, después de la adición del antígeno de interés al pocillo revestido, se puede añadir un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable. Un experto en la técnica tendría los conocimientos relativos a los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada así como a otras variaciones de ELISAs conocidas en la técnica. Para una discusión adicional en relación con ELISAs, véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (redactores), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, John Wiley & Sons, Inc., New, York, Sección 11.2.1
 35 40 45

Alternativa o adicionalmente, puede resultar deseable explorar los anticuerpos que tienen una afinidad ligante deseada, los que reconocen un epítipo específico, o aquellos anticuerpos con una actividad funcional, tales como anticuerpos neutralizantes, anticuerpos antagonistas o anticuerpos agonistas. Los ensayos para dichas propiedades son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, una exploración funcional de la unión receptor/ligando.
 50

Puesto que el método del invento se lleva a cabo utilizando una serie de recipientes unitarios, se prefiere que el sobrenadante de cultivo de los recipientes unitarios individuales sea ensayado para identificar los recipientes que son positivos en cuanto a anticuerpos que tienen la función deseada. Se pueden llevar a cabo uno o más ensayos sobre el sobrenadante de cultivo de los recipientes unitarios. Por ejemplo, puede ser deseable llevar primero a cabo un ensayo para determinar los recipientes unitarios positivos en cuanto a anticuerpos que se unen a un antígeno de interés. Aquellos recipientes unitarios que son positivos en cuanto a anticuerpos que se unen al antígeno de interés pueden ser luego explorados en cuanto a la presencia de anticuerpos que tengan una afinidad deseada o en cuanto a la presencia de anticuerpos que sean anticuerpos neutralizantes, anticuerpos antagonistas o agonistas, etc.
 55 60

La afinidad ligante de un anticuerpo hacia un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden ser determinadas mediante un análisis BIAcoreTM o mediante ensayos de unión competitiva. BIAcoreTM es un sistema automatizado de biosensores que puede ser utilizado para medir interacciones moleculares (Karlsson *et al.*, 1991, J. Immunol. Methods 145: 229-240). Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno radiomarcado (por ejemplo, con ³H o ¹²⁵I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido
 65

al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno concreto y las velocidades de disociación pueden ser determinadas a partir de los datos mediante un análisis gráfico de Scatchard.

La competición con un segundo anticuerpo puede ser también determinada utilizando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno es incubado con el anticuerpo de interés conjugado con un radiomarcador (por ejemplo, de ^3H o ^{125}I), en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

Preferiblemente, se lleva a cabo un ensayo para identificar los recipientes unitarios que son positivos en cuanto a la presencia de anticuerpos de alta afinidad (anticuerpos que tienen una afinidad en el intervalo picomolar).

Las células que son identificadas por ser capaces de producir anticuerpos con una función deseada comprenden (y consisten preferiblemente en) células que producen anticuerpos con una función deseada.

Se pueden sintetizar directa o indirectamente anticuerpos a partir de las células que son capaces de producir anticuerpos con una función deseada y que se obtienen en la operación (e) del procedimiento. En una realización del invento, la operación (e) del primer aspecto del invento no comprende el aislamiento de células individuales que producen anticuerpos que tienen la función deseada.

Preferiblemente, el anticuerpo deseado se obtiene de un recipiente unitario cuyo contenido es clonal. El anticuerpo deseado puede ser sintetizado directa o indirectamente a partir de las células presentes en el recipiente unitario o a partir de sus descendientes.

Se puede llevar a cabo la síntesis directa cultivando al menos una de las células B (o un descendiente de la misma) en un medio apropiado. Preferiblemente, se cultivan las células presentes en un recipiente unitario identificado por ser positivo en cuanto a la presencia de células capaces de producir anticuerpos con una función deseada y se obtiene el anticuerpo a partir de las mismas, purificando opcionalmente dicho anticuerpo.

Se puede llevar a cabo la síntesis indirecta aislando los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo y haciendo que se expresen (o una versión modificada de los mismos) en una célula huésped. Se pueden clonar los genes enteros o se pueden clonar las regiones variables o porciones de las mismas que confieren la función deseada del anticuerpo, y se pueden utilizar para producir anticuerpos recombinantes. Preferiblemente, se aísla el ácido nucleico que codifica las regiones V_H y/o V_L o que contiene al menos una región determinante de complementariedad (CDR; del inglés, complementarity determining region).

Los anticuerpos recombinantes pueden tomar diversas formas diferentes e incluyen inmunoglobulinas completas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y fragmentos ligantes de antígeno tales como los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, y cualesquier derivados de los mismos, tales como fragmentos Fv de cadena sencilla. Los métodos para crear estas moléculas de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Boss *et al.*, US 4.816.397; Cabilly *et al.*, US 6.331.415; Shrader *et al.*, WO 92/02551; Ward *et al.*, 1989, Nature 341: 544; Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 322: 323; Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423; Queen *et al.*, US 5.585.089; Adair, WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10: 1-142; y Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods 216: 165-181).

En una realización, los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son multiplicados a partir de las células cultivadas o de sus descendientes. Se puede llevar directamente a cabo la multiplicación sobre las células cultivadas o sobre sus descendientes o puede haber una operación de recuperación de ácido nucleico antes de la multiplicación. Cuando se emplean recipientes unitarios, los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son multiplicados a partir de un recipiente unitario identificado como positivo.

Preferiblemente, la multiplicación se lleva a cabo utilizando el sobrenadante de cultivo (por ejemplo, en forma de una suspensión celular) de un recipiente unitario identificado como positivo. De nuevo, hay que resaltar que, contrariamente a las técnicas del campo técnico previo, se puede multiplicar el ácido nucleico de recipientes unitarios en que se ha cultivado un número de células genéticamente distintas.

Por medio de la apropiada selección de cebadores, se puede multiplicar la secuencia completa que codifica el anticuerpo o, alternativamente, se pueden multiplicar las regiones variables o porciones de las mismas que confieren la función deseada del anticuerpo. En WO 92/02551, Babcook *et al.*, *supra*, y Weitkamp *et al.*, 2003, Journal of Immunological Methods 275: 223-237, se describen métodos para diseñar cebadores para multiplicar todos los segmentos de genes V_H y V_L .

Los métodos para la multiplicación de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Cuando el ácido nucleico que se ha recuperado es RNA, el RNA es preferiblemente transcrito inversamente para obtener cDNA.

Preferiblemente, se utiliza la PCR para la multiplicación, preferiblemente la RT-PCR. Los detalles de la multiplicación, por PCR, de secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos se exponen en WO 92/02551 y se incorporan aquí por referencia.

Además de la PCR, se pueden utilizar otros procedimientos de multiplicación. Otros procedimientos de multiplicación incluyen los métodos de T7 y replicasa Q. La descripción de estos métodos en WO 92/02551 se incorpora aquí por referencia.

5 Aunque el contenido de cada recipiente unitario es generalmente clonal, puede que de vez en cuando el contenido no sea clonal en algunos recipientes unitarios, es decir, que más de un anticuerpo esté presente en el recipiente unitario y que, en consecuencia, de ese recipiente unitario se pueda aislar ácido nucleico que corresponda a más de un anticuerpo. En los casos en que se aisle ácido nucleico que corresponda a más de un anticuerpo, será necesario determinar cuáles de las secuencias aisladas corresponden a anticuerpos con la función deseada. Como se verá en el Ejemplo 1
10 más adelante, esto puede acarrear ensayar las diversas combinaciones de las secuencias de V_H y V_L multiplicadas (o porciones de las mismas) para determinar aquellas combinaciones que producen anticuerpos que son capaces de unirse al antígeno de interés. Alternativamente, cuando del mismo recipiente unitario se aísla ácido nucleico que corresponde a más de un anticuerpo, puede haber ocasiones en que se aísla la misma secuencia más de una vez, y esta secuencia dominante puede ser preferentemente ensayada, como en el Ejemplo 3. También se puede hallar la misma secuen-
15 cia en más de un recipiente unitario, y esta secuencia puede ser preferentemente ensayada como se describe en el Ejemplo 3.

En consecuencia, el método del primer aspecto del invento puede comprender además la operación de que, cuando se multiplique ácido nucleico que corresponda a más de un anticuerpo, se determine la capacidad del ácido nucleico
20 multiplicado para producir anticuerpos con la función deseada. De este modo, el ácido nucleico multiplicado que es capaz de producir anticuerpos con la función deseada puede ser identificado y seleccionado.

En cierto grado, el porcentaje de recipientes unitarios “clonales” es un compromiso entre un número aceptable de recipientes unitarios que son positivos en cuanto a anticuerpos con la función deseada, y un número aceptable de
25 recipientes unitarios “no clonales”. Cuanto mayor es el porcentaje de recipientes unitarios positivos presentes, menor es la probabilidad de que el contenido de los recipientes vaya a ser clonal. El porcentaje de recipientes unitarios “clonales” dependerá de diversos factores que incluyen el título sérico utilizado y el número de células B por pocillo. Las personas expertas en la técnica serán capaces de alcanzar un apropiado porcentaje de recipientes unitarios “clonales” adaptando las condiciones del ensayo según sea apropiado. Los factores que afectan al porcentaje de recipientes uni-
30 tarios “clonales” incluyen el número de células B presentes por pocillo antes de la separación por inmunoafinidad. 100-20.000 células B/pocillo antes de la separación por inmunoafinidad da normalmente lugar a 1 clon por pocillo. El número de células B por pocillo antes de la separación por inmunoafinidad dependerá del título sérico utilizado, como se describió previamente.

35 En una realización, los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son aislados determinando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo (o partes del mismo) y deduciendo a partir de ella una secuencia de ácido nucleico que codifique el anticuerpo o partes del mismo. Cuando se emplean recipientes unitarios, se determina la secuencia de un anticuerpo presente en un recipiente unitario positivo. A causa de la degeneración del código genético, existirán muchas secuencias de ácido nucleico diferentes capaces de codificar el anticuerpo o porciones del mismo y, por lo
40 tanto, se puede deducir un número de secuencias de ácido nucleico adecuadas a partir de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o de porciones del mismo.

Como se discutió anteriormente, en algunos casos, se pueden producir más de un anticuerpo por recipiente unitario. A la vista de esto, en una realización, el método comprende verificar que la secuencia de aminoácidos es de un
45 anticuerpo con la función deseada. Alternativamente, antes de determinarse la secuencia de aminoácidos, se pueden purificar primero los anticuerpos presentes en un recipiente unitario para asegurar que el anticuerpo que se secuencia es un anticuerpo con la función deseada.

En una realización, los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son modificados antes de la expre-
50 sión. Los métodos para modificar ácidos nucleicos serán bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio. Se pueden hacer modificaciones del ácido nucleico en uno o más sitios. Preferiblemente el ácido nucleico es modificado para que una función deseada del aminoácido codificado resulte potenciada; por ejemplo, que el anticuerpo resultante tenga una afinidad ligante aumentada. Otras posibles modi-
55 ficaciones incluyen modificaciones para aumentar la estabilidad del ácido nucleico y modificaciones que confieren propiedades adicionales al polipéptido codificado.

Los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo (o versiones modificadas de los mismos) se pueden expresar en una célula huésped para obtener un anticuerpo con la función deseada.

60 Adecuadamente, el ácido nucleico se incorpora a uno o más vectores para su expresión en una célula huésped.

En la técnica se conocen diversos sistemas de expresión asequibles para producir los anticuerpos del invento, sistemas que incluyen sistemas de expresión de bacterias, levaduras, insectos y mamíferos (véase, por ejemplo, Verma
65 *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods* 216: 165-181).

En el invento, se utiliza la separación por inmutofafnidad para obtener un anticuerpo con la función deseada. De esta manera, se proporciona un método para obtener un anticuerpo con una función deseada, método que comprende:

- a) poner una población de células B en contacto con una serie de recipientes unitarios a los que se ha unido un agente captor;
- b) separar de los recipientes unitarios aquellas células B que no se han unido al agente captor, mientras se conservan aquellas células B que se han unido al agente captor;
- c) cultivar una pluralidad de las células B captadas en aquellos recipientes unitarios en que han quedado retenidas, preferiblemente bajo unas condiciones adecuadas para multiplicación clonal;
- d) explorar el contenido de al menos un recipiente unitario para identificar por ello al menos un recipiente unitario positivo en cuanto a la presencia de células capaces de producir un anticuerpo con la función deseada; y
- e) obtener el anticuerpo deseado directa o indirectamente de dicho recipiente unitario.

Se pueden obtener anticuerpos mediante el primer aspecto del invento. Los anticuerpos pueden poseer diversas modificaciones. Por ejemplo, para cualquier finalidad diagnóstica o terapéutica adecuada, los anticuerpos pueden ser conjugados con una o más moléculas informadoras o efectoras.

En general, el anticuerpo será capaz de unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno celularmente asociado, tal como, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular de células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también pueden ser cualesquier antígenos medicamente relevantes tales como los antígenos suprarregulados durante una enfermedad o una infección, tales como, por ejemplo, receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos particulares de antígenos de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, tales como, por ejemplo, integrinas tales como integrinas $\beta 1$, tales como, por ejemplo, VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, antígeno carcinoembrionario (CEA; del inglés, carcinoembryonic antigen), globulina de la grasa de la leche humana (HMFG 1 y 2; del inglés, human milk fat globulin), antígenos de MHC de clase I y MHC de clase II, y VEGF, y, cuando es apropiado, receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 e IL-17, antígenos víricos tales como, por ejemplo, antígenos de citomegalovirus o del virus respiratorio sincitial, inmunoglobulinas tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β e interferón γ , factor α de necrosis tumoral, factor β de necrosis tumoral, factores estimuladores de colonias, tales como G-CSF y GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas, tales como PDGF- α y PDGF- β , y, cuando es apropiado, receptores los mismos.

Preferiblemente, el anticuerpo obtenido mediante el método del presente invento se une a IL-17. Cuando se desea producir anticuerpos que reconozcan IL-17, el antígeno de interés utilizado en el ensayo anteriormente descrito será entonces IL-17, preferiblemente IL-17 humana.

Como se mencionó anteriormente, el método del presente invento es particularmente adecuado para la identificación de anticuerpos de alta afinidad, típicamente anticuerpos que tienen una afinidad en el intervalo picomolar, tales como aquellos con una afinidad ≤ 200 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM o 1 pM. En el caso de anticuerpos de afinidad particularmente elevada, puede ser más apropiado describirlos en términos de su velocidad de disociación. En una realización del invento, se proporcionan anticuerpos con una velocidad de disociación inferior a 1×10^6 s $^{-1}$. Se considera que un anticuerpo tiene una velocidad de disociación inferior a 1×10^6 s $^{-1}$ si su constante de velocidad de disociación es inmensurable al utilizar el análisis BIAcoreTM.

Se proporciona un anticuerpo hacia IL-17, preferiblemente IL-17 humana, que tiene una afinidad en el intervalo picomolar. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad ≤ 200 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM o 1 pM.

En consecuencia, el método es un método para obtener un anticuerpo hacia IL-17 que tenga una afinidad en el intervalo picomolar. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad ≤ 200 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM o 1 pM.

Los anticuerpos producidos por el invento tienen diversos usos para tratamiento (tanto terapéutico como profiláctico), diagnóstico e investigación. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos hacia microorganismos patógenos para el tratamiento de infecciones por los organismos. Dichos anticuerpos pueden ser también utilizados para diagnóstico, sea *in vivo* o sea *in vitro*. Los anticuerpos dirigidos contra receptores celulares pueden ser utilizados para el agonismo o antagonismo de la función receptora. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra moléculas de adhesión para reducir una respuesta inmune indeseada. Dichos anticuerpos pueden ser también usados para la formación *in vivo* de imágenes de inflamación. Otros anticuerpos pueden ser dirigidos contra antígenos tumorales y pueden ser utilizados directamente o en combinación con una molécula efectora para la eliminación de células tumorales. También se pueden utilizar anticuerpos para el diagnóstico, sea *in vitro* o sea *in vivo*.

Se describe un conjunto de anticuerpos de alta afinidad. El término “conjunto” se usa aquí para significar un grupo de dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 8, 10 o más) anticuerpos que tienen la misma función deseada; por ejemplo, que se unen al mismo antígeno. El método de acuerdo con el presente invento permite que se obtengan sencilla y directamente conjuntos de anticuerpos de alta afinidad. Es particularmente adecuado para obtener conjuntos en que cada anticuerpo tiene una afinidad ≤ 200 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM, 10 pM o 1 pM. Los anticuerpos individuales con una afinidad por un antígeno concreto tan elevada como ésta son raros y, hasta la fecha, ha sido difícil generarlos. El conjunto de anticuerpos de alta afinidad proporciona un banco sesgado de anticuerpos a partir del cual se pueden obtener anticuerpos útiles mediante, por ejemplo, una exploración adicional.

Otros aspectos incluyen:

- i) un método para aislar los genes que codifican un anticuerpo que tiene una función deseada o partes del mismo, método que es como se describió anteriormente;
- ii) un vector que comprende los genes que codifican un anticuerpo que tiene una función deseada o partes del mismo, método que es como se describió anteriormente;
- iii) una célula huésped transformada con los genes que codifican un anticuerpo que tiene una función deseada o partes del mismo, y sus descendientes, método que es como se describió anteriormente; y
- iv) un método para obtener un anticuerpo que tenga una función deseada, método que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con iii) y obtener el anticuerpo producido por la célula huésped.

Ejemplos

El presente invento será ahora descrito sólo a modo de ejemplo, en el que se hace referencia a:

Figura 1: Unión de anticuerpos, secretados a sobrenadantes de cultivo, a una proteína de fusión de CD4 de ratamolécula coestimuladora de ratón en fase sólida. Los sobrenadantes tomados de los cultivos, en los que se había llevado a cabo una separación por inmutuafinidad sólo en los pocillos bloqueados, fallaron a la hora de unirse al antígeno (columnas 7-12). Aproximadamente el 39% de los pocillos, en que se había producido un enriquecimiento específico con células B del equivalente de 0,2 ml de sangre por placa, contenían anticuerpo específico.

Figura 2: Unión de anticuerpos secretados a sobrenadantes de cultivo, a una proteína de fusión de CD4 de ratamolécula coestimuladora de ratón en fase sólida. Los sobrenadantes tomados de los cultivos, en los que se había llevado a cabo una separación por inmutuafinidad sólo en los pocillos bloqueados, fallaron a la hora de unirse al antígeno (columnas 7-12). Aproximadamente el 89% de los pocillos, en que se había producido un enriquecimiento específico con células B del equivalente de 1 ml de sangre por placa, contenían anticuerpo específico.

Figura 3: Gel de agarosa de los productos de la 2ª PCR. 4 productos para cada uno de los ocho pocillos seleccionados. Muestra 1, carriles 1, 3, 5, 7; Muestra 2, carriles 9, 11, 13, 15; Muestra 3, carriles 2, 4, 6, 8; Muestra 4, carriles 10, 12, 14, 16; Muestra 5, carriles 17, 19, 21, 23; Muestra 6, carriles 25, 27, 29, 31; Muestra 7, carriles 18, 20, 22, 24; Muestra 8, carriles 26, 28, 30 y 32 VH (fila superior), VK (fila inferior).

Figura 4: ELISA para IgG, de sobrenadantes de CHO.

Figura 5: ELISA para molécula coestimuladora de ratón, con sobrenadantes de CHO.

Figuras 6A-D: Unión de anticuerpos, que habían sido secretados a sobrenadantes de cultivo, a una proteína IL-17 humana en fase sólida mediante ELISA en cuatro placas de microtitulación (6A-D). La presencia de anticuerpo de rata unido fue revelada con un anticuerpo policlonal anti-Fc de rata, generado en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano picante. Los sobrenadantes tomados de los cultivos, en los que se había llevado a cabo una separación por inmutuafinidad sólo en los pocillos bloqueados, fallaron a la hora de unirse al antígeno (6D, columnas 7-12).

Figura 7A: Anticuerpos anti-IL-17 humana de rata obtenidos mediante separación por inmutuafinidad, en un bioensayo con IL-17 recombinante de mono Cynomolgus.

Figura 7B: Anticuerpos anti-IL-17 humana de rata obtenidos mediante separación por inmutuafinidad en un bioensayo con IL-17 humana recombinante.

Figura 8: Unión de anticuerpos de sobrenadantes de cultivo de una placa a la que se habían añadido células del equivalente de 3 ml de sangre, a una proteína de fusión de CD4 de ratamolécula coestimuladora de ratón en fase sólida, mediante ELISA. Las columnas 7 a 12 corresponden a sobrenadantes de pocillos en los que se habían utilizado células CHO no transfectadas.

ES 2 341 544 T3

Figura 9: Unión de anticuerpos de sobrenadantes de cultivo de una placa a la que se habían añadido células del equivalente de 0,3 ml de sangre, a una proteína de fusión de CD4 de rata-molécula coestimuladora de ratón en fase sólida, mediante ELISA. Las columnas 7 a 12 corresponden a sobrenadantes de pocillos en los que se habían utilizado células CHO no transfectadas.

Figura 10: Análisis, por ELISA, de la expresión transitoria de clones en células CHO que muestran expresión de IgG.

Figura 11: Análisis, por ELISA, de la expresión transitoria de clones en células CHO que muestran unión a una molécula coestimuladora de ratón.

Figura 12: Un protocolo de separación por inmunoafinidad de acuerdo con el presente invento.

Ejemplo 1

Separación por inmunoafinidad sobre una molécula coestimuladora purificada de ratón en fase sólida

Se inmunizaron conejos con cuatro inyecciones subcutáneas de una proteína de fusión de CD4 de rata-molécula coestimuladora de ratón a intervalos de tres semanas y se prepararon células B de sangre periférica en una fracción mononuclear sobre Lympholyte-Rabbit CL-5050 (Cedarlane Laboratories, Ltd.).

Se esterilizaron placas para ELISA con etanol al 70%, se lavaron tres veces con PBS estéril y se dejaron secar al aire antes de ser revestidas con la proteína de fusión de CD4 de rata-molécula coestimuladora de ratón en una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$, durante la noche, a 4°C. Las placas fueron lavadas tres veces en PBS estéril, bloqueadas con PBS-FCS al 10% durante una hora y luego lavadas una vez en PBS. Se añadieron células de la fracción mononuclear de sangre periférica de un animal inmunizado, en el equivalente de 0,2 ml de sangre/placa (300 células/pocillo) y 1 ml de sangre/placa (1500 células/pocillo) y se dejó que se unieran durante una hora a 37°C. Después de un lavado a fondo con medio (diez veces), durante el cual se separaron las células mononucleares y las células B que expresaban anticuerpos irrelevantes, las células B restantes, que expresaban anticuerpos específicos, fueron cultivadas en presencia de antígeno revestido, medio acondicionado de células T (3%) y células EL-4 (5×10^4 /pocillo) durante siete días.

Los anticuerpos secretados a los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados en cuanto a la unión a la proteína de fusión de CD4 de rata-molécula coestimuladora de ratón en fase sólida, mediante ELISA, utilizando un producto de conjugación de peroxidasa de rábano picante y anti-Fc de conejo generado en cabra para revelar la presencia de anticuerpo unido por medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm. Los sobrenadantes tomados de los cultivos, en los que se había llevado a cabo una separación por inmunoafinidad sólo en los pocillos bloqueados, fallaron a la hora de unirse al antígeno (columnas 7-12). Aproximadamente el 39% de los pocillos, en que se había producido un enriquecimiento específico con células B del equivalente de 0,2 ml de sangre por placa, contenían anticuerpo específico (Figura 1), con el 89% de los pocillos positivos a partir del equivalente de 1 ml de sangre por placa (Figura 2).

PCR de los pocillos procedentes de la separación por afinidad en fase sólida con una molécula coestimuladora de ratón

Se seleccionaron los siguientes pocillos para un procesamiento adicional: A2, E3, F2 y G6 del equivalente de 0,2 ml de sangre por placa, y D6, F4, G3 y H6 del equivalente de 1,0 ml de sangre por placa (numerados 1-8, respectivamente). Se sacaron las placas de cultivo celular del congelador a -80°C y se descongelaron los pocillos pipeteando suavemente arriba y abajo con varios cambios de 100 μl de medio caliente (DMEM o RPMI con medio acondicionado de células T al 1-6%). La suspensión celular fue añadida a un tubo Eppendorf estéril y fue luego centrifugada a 2000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga de mesa de laboratorio, hecha girar 180° y centrifugada de nuevo (esto ayuda a la formación de un sedimento compacto). Se separó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 μl de medio fresco (DMEM o RPMI con medio acondicionado de células T al 1-6%). Esta suspensión fue luego dividida en 4 partes alícuotas de 2,5 μl para PCR. Luego se llevó a cabo una RT-PCR primaria utilizando el kit RobusT para RT-PCR de MJ Research (n° F-580L del catálogo) usando la siguiente mezcla por tubo con objeto de aislar genes de regiones variables de anticuerpo:

ES 2 341 544 T3

		μl
	Agua DEPC	35,5
5	Tampón 10x	5
	dNTPs	1
	NP-40 al 10%	2,5
10	RNasin (Promega, nº N2511 del catálogo)	0,5
	RT	1
15	Polimerasa	2
	1ª mezcla de cebadores (10 μM cada cebador)	1
	Los cebadores se basaron en secuencias líder de consenso y secuencias de regiones constantes	
20	MgCl ₂	1,5
	Volumen total:	50

Programa de PCR:

30	1. 50 °C	30 minutos
	2. 94 °C	2 minutos
	3. 94 °C	1 minuto
35	4. 55 °C	1 minuto
	5. 72 °C	1 minuto
40	6. ir a la operación 3	40 ciclos en total
	7. 72 °C	5 minutos
	8. 4 °C	mantenimiento

45
Luego se usó 1 μl de esta mezcla de reacción para sembrar productos de reacciones PCR secundarias de VH y Vκ separados utilizando el kit KOD HiFi de inicio en caliente (Novagen, nº 71086-3 del catálogo) y cebadores anidados que contenían sitios de restricción únicos para multiplicar las regiones variables. Se preparó la siguiente mezcla por tubo:

		μl
	H ₂ O d estéril	17,75
55	Tampón para PCR KOD 10x	2,5
	Inicio en caliente KOD HiFi	0,5
	NTPs (2 mM)	2,5
60	2ª mezcla de cebadores, Vκ o VH (10 μM cada cebador)	0,75
	MgSO ₄ (25 mM)	1
65	Volumen total:	25

ES 2 341 544 T3

Programas de PCR:

5	VH		Vκ	
	1. 96 °C	2 minutos	1. 96 °C	2 minutos
	2. 96 °C	15 s	2. 96 °C	15 s
10	3. 68 °C	20 s	3. 68 °C	5 s
	4. ir a la operación 2	40 ciclos en total	4. ir a la operación 2	40 ciclos en total
15	5. 4 °C	mantenimiento	5. 4 °C	mantenimiento

20 Después de la 2ª PCR, se comprobaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3). Este gel sugería que se generaban productos de PCR de los 8 pocillos procesados.

Clonación de fragmentos de PCR

25 Los fragmentos de PCR fueron purificados usando el kit de purificación de PCR Qiaquick 8 de Qiagen (nº 28144 del catálogo) y fueron eluidos en 60 µl de tampón de elución. Los fragmentos de VH fueron digeridos con XhoI e HindIII y fueron clonados en el vector de expresión pMRR14 (construcción de expresión de mamífero que contiene CH1, 2 y 3 de γ4 humano). Los fragmentos de Vκ fueron digeridos con BsiWI e HindIII y fueron clonados en pMRR10.1 (construcción de expresión de mamífero que contiene Cκ humano). Ambos vectores de expresión se describen en el Documento WO/03093320. Esto da lugar a la formación de genes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo quimérico de conejo-ser humano. Se secuenciaron 8 x VH y 8 x VL clones (DNA plasmídico de colonias transformadas individuales) de cada uno de los 8 pocillos y se llevaron a cabo alineaciones intrapocillos.

35 Todas las secuencias de los pocillos 1-5, 7 y 8 representaban el mismo gen de variable de anticuerpo con algunos errores menores de PCR; es decir, cada uno de los pocillos era clonal. Sin embargo, el pocillo 6 presentaba 3 secuencias VH diferentes y 3 secuencias VL diferentes, aunque había una secuencia dominante en ambos casos (VH6.1 y Vκ6.1). Se identificaron secuencias de consenso y se usaron parejas de clones relevantes para la expresión transitoria de IgGs quiméricas de conejo-ser humano en células CHO usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº 11668-019 del catálogo) para transfección de acuerdo con las directrices del fabricante. Adviértase que hubo nueve combinaciones de parejas de VH y VL para el pocillo 6 (6.1-6.9) (véase la Tabla 1).

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 1

Parejas de VH y Vκ para expresión transitoria de IgGs quiméricas en CHO

	Id. de la muestra	Consenso de VH	Consenso de Vκ
5	1	VH1	Vκ1
10	2	VH2	Vκ2
	3	VH3	Vκ3
	4	VH4	Vκ4
15	5	VH5	Vκ5
	7	VH7	Vκ7
	8	VH8	Vκ8
20	6.1	VH6.1	Vκ6.1
	6.2	VH6.1	Vκ6.2
25	6.3	VH6.1	Vκ6.3
	6.4	VH6.2	Vκ6.1
	6.5	VH6.2	Vκ6.2
30	6.6	VH6.2	Vκ6.3
	6.7	VH6.3	Vκ6.1
	6.8	VH6.3	Vκ6.2
35	6.9	VH6.3	Vκ6.3

40 *Análisis de IgGs recombinantes expresadas*

Después de una expresión de 5 días, los sobrenadantes de los cultivos de CHO fueron recogidos y fueron examinados en cuanto a la presencia de IgG y a su capacidad para unirse a la molécula coestimuladora de ratón.

45 Para el ELISA de IgG, las placas fueron revestidas con 2 µg/ml de anticuerpo anti-Fc humano y fueron luego bloqueadas en bloqueador de PEG durante 1 hora a temperatura ambiental. Las placas fueron lavadas 3 veces antes de que se añadieran los sobrenadantes de los cultivos de CHO que contenían IgG a los pocillos y fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiental.

50 Se lavaron de nuevo 3 veces las placas y luego se añadió anti-F(ab)₂ humano-HRP en una dilución 1:5000 en bloqueador de PEG a los pocillos y se incubó a temperatura ambiental durante 1 hora. Después del lavado, se desarrollaron las placas con tetrametilbencidina (TMB) y se midió la absorbancia a 630 nm (véase la Figura 4).

55 Para el ELISA de la molécula coestimuladora de ratón, las placas fueron revestidas con 2 µg/ml de molécula coestimuladora de ratón y fueron luego bloqueadas en bloqueador de PEG durante 1 hora a temperatura ambiental. Las placas fueron lavadas 3 veces antes de que se añadieran los sobrenadantes de los cultivos de CHO que contenían IgG a los pocillos y fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiental.

60 Se lavaron de nuevo 3 veces las placas y luego se añadió anti-Fc humano-HRP en una dilución 1:5000 en bloqueador de PEG a los pocillos y se incubó a temperatura ambiental durante 1 hora. Después del lavado, se desarrollaron las placas con TMB y se midió la absorbancia a 630 nm (véase la Figura 5).

65 Los pocillos 1, 2, 3, 5, 7 y 8 produjeron un anticuerpo quimérico recombinante que conservaba su capacidad para unirse a la molécula coestimuladora de ratón. El pocillo 4 falló a la hora de producir una IgG correctamente ensamblada. De las 9 posibles combinaciones de IgG (3VH x 3VL) del pocillo 6, seis combinaciones produjeron un anticuerpo apropiadamente ensamblado. Sin embargo, sólo una de éstas, 6.1, produjo un anticuerpo capaz de unirse a la molécula coestimuladora de ratón. Es interesante resaltar que esta combinación representaba el anticuerpo que se preparó a partir de los genes VH y Vκ que eran más dominantes en el análisis secuencial. En resumen, después

de la separación por inmutuafinidat con células B sobre antígeno en fase sólida, de 7 de los 8 pocillos se aislaron anticuerpos recombinantes que se unían a la molécula coestimuladora de ratón. Incluso en el caso del pocillo 6, que no era clonal, se pudo recuperar IgG funcional ligante de antígeno.

Medición de IgGs recombinantes por afinidad BIAcore

La IgG recombinante de los sobrenadantes de los cultivos de CHO fue captada en un chip BIAcore™ revestido con anticuerpo anti-Fc humano. Luego se aplicó la molécula coestimuladora de ratón al chip y se determinó una afinidad (Tabla 2). De los resultados resulta evidente que, utilizando el método del presente invento, es posible aislar directamente un conjunto de anticuerpos de alta afinidad mediante la exploración de sólo dos placas de microtitulación.

TABLA 2

Medición de IgG recombinante de sobrenadantes de cultivos de CHO por afinidad

Muestra	Conc. (µg/ml)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
Pocillo 1	0,769	1,09e6	1,49e-6	1,36
Pocillo 2	5,450	1,04e6	4,45e-5	43,0
Pocillo 3	3,159	9,13e5	6,82e-6	7,46
Pocillo 4	SIA			
Pocillo 5	3,258	1,85e6	1,6e-5	8,66
Pocillo 6.1	4,790	6,17e5	1,26e-4	204
Pocillo 7	3,025	7,31e5	1,25e-6	1,71
Pocillo 8	3,900	2,11e6	1,67e-4	79,1
Pocillo 6.8	2,801	SU	SU	SU
SIA = sin expresión de anticuerpo				
SU = sin unión a CD4-molécula coestimuladora de ratón				

Ejemplo 2

Separación por inmutuafinidat sobre IL17 purificada humana en fase sólida

Se inmunizaron ratas con cuatro inyecciones intraperitoneales de IL-17 humana en intervalos de tres semanas y se prepararon suspensiones celulares individuales a partir de los bazo.

Se esterilizaron placas para ELISA con etanol al 70%, se lavaron tres veces con PBS estéril y se dejaron secar al aire antes de ser revestidas con la proteína IL-17 humana en una concentración de 1,25 µg/ml, durante la noche, a 4°C. Las placas fueron lavadas tres veces en PBS estéril, bloqueadas con PBS-FCS al 10% durante una hora y luego lavadas una vez en PBS. Se añadieron células esplénicas de un animal inmunizado a cuatro placas en una cantidad de 50.000 por pocillo y se dejó que se unieran durante una hora a 37°C. Después de un lavado a fondo con medio (diez veces), durante el cual se separaron las células mononucleares y las células B que expresaban anticuerpos irrelevantes, las células B restantes, que expresaban anticuerpos específicos, fueron cultivadas en presencia de antígeno revestido, medio acondicionado de células T (3%) y células EL-4 (5x10⁴/pocillo) durante seis días. Los anticuerpos que habían sido secretados a los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados en cuanto a su capacidad para unirse a la proteína IL-17 humana en fase sólida, mediante ELISA en cuatro placas de microtitulación (Figuras 6A-D). La presencia de anticuerpo de rata unido fue revelada con un anticuerpo policlonal anti-Fc de rata generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano picante. Los sobrenadantes tomados de los cultivos, en los que se había llevado a cabo una separación por inmutuafinidat sólo en los pocillos bloqueados, fallaron a la hora de unirse al antígeno (placa 4, columnas 7-12, Figura 6D). Los sobrenadantes de los cultivos de la Placa 2 (Figura 6B) fueron adicionalmente explorados en un ensayo funcional *in vitro* para medir el bloqueo de la liberación de IL-6 inducida por IL-17. Se incubaron 60 µl de sobrenadante neto de cultivo con 60 µl de hIL-17 (25 ng/ml) más hTNF (2,5 ng/ml). Se incubaron conjuntamente estos compuestos durante 30 minutos y luego se añadieron 100 µl de la mezcla a 100 µl de células

ES 2 341 544 T3

(células 3T3 - NIH, sembradas en una densidad de $0,75 \times 10^4$ células/pocillo 24 horas antes del ensayo; antes del ensayo, las células fueron lavadas una vez en medio fresco). Esto proporciona un factor de dilución final de 1:4. Las placas fueron incubadas durante 18 horas (a 37°C), después de las cuales se tomaron $100 \mu\text{l}$ de sobrenadante y se ensayaron en cuanto a la presencia de mIL-6 mediante un ELISA. Se determinaron las concentraciones de mIL-6 usando una curva patrón y se calculó el porcentaje de inhibición de un pocillo dado.

Los valores mostrados en la Tabla 3 son porcentajes de inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-17 en fibroblastos 3T3. Se omitieron las filas A, G y H a causa de falta de sobrenadante de cultivo. En la tabla se destacan los bloqueadores superiores o iguales a 75%.

TABLA 3

Placa 2

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	44	26	73	26	37	38		53	15	38
C	50	53	37	35	45	44	40		48	31
D		45	74	16	45		71	16	15	30
E	56	70		34	41	48		36	-27	21
F	42			68	18	-30	68	61	59	53

Se seleccionaron los dos mejores pocillos, C9 y D2, para un análisis adicional y el aislamiento de las regiones variables.

Multiplicación por transcripción inversa y PCR

Se sintetizó DNA complementario directamente de células de los dos pocillos seleccionados, utilizando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y cebadores antisentido específicos para C_H1 , C_κ y C_λ . Se complementó la mezcla de reacción con NP-40 al 0,5% (Calbiochem) y RNasin (Promega) y se llevó a cabo la síntesis a 50°C durante 60 minutos, lo que fue seguido de una operación de desnaturalización a 70°C durante 15 minutos.

Los cDNAs fueron luego multiplicados (40 ciclos: 94°C , 3 minutos; 94°C , 30 segundos; 50°C , 30 segundos; 72°C , 1 minuto; operación de extensión final a 72°C , 5 minutos) usando el sistema de PCR TaqPlus Precision de Stratagene, complementado con dNTPs (Invitrogen), cada uno $50 \mu\text{M}$, y cebadores específicos para las conocidas familias de regiones variables y las regiones constantes de cada una de las cadenas de anticuerpo. Se utilizaron tubos separados para las multiplicaciones de las cadenas V_H , V_κ y V_λ , conteniendo cada tubo la décima parte del cDNA generado a partir de los linfocitos de cada pocillo separados por inmunoadfinidad.

Para multiplicar más los productos de PCR e introducir sitios para enzimas de restricción para una subsiguiente clonación, se llevó a cabo una PCR semianidada. Se transfirió $1 \mu\text{l}$ de los $50 \mu\text{l}$ de cada una de las mezclas de reacción PCR primarias a un tubo que contenía versiones equivalentes de los cebadores primarios pero al que se habían añadido sitios adecuados para enzimas de restricción. De nuevo, se utilizó el sistema de PCR TaqPlus Precision, pero bajo unas condiciones modificadas en cuanto a la generación de los ciclos (40 ciclos: 94°C , 3 minutos; 94°C , 30 segundos; 55°C , 30 segundos; 72°C , 1 minuto; operación de extensión final a 72°C , 5 minutos).

Se sometieron los productos de PCR a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se aislaron las bandas con los tamaños previstos. Los fragmentos fueron luego digeridos (V_H - HindIII-XhoI; V_κ y V_λ - HindIII-BsiWI), purificados y ligados en los sitios correspondientes de los vectores de expresión pMRR14 (V_H) y pMRR10.1 (V_κ y V_λ).

El análisis de los V_H y V_κ clonados indicó que las secuencias de ambos pocillos eran clonales. Se llevó a cabo la expresión transitoria de ambos clones en células CHO del modo descrito en el Ejemplo 1. Se mostró que el anticuerpo recombinante de D2 inhibía la producción de IL-6, mediada por IL-17, de los fibroblastos humanos primarios (Figura 7).

Datos de BIAcore™

Se captó IgG recombinante de los sobrenadantes de los cultivos de CHO en un chip BIAcore™ revestido con anticuerpo anti-Fab, se hizo pasar IL-17 por encima en fase de disolución y se determinó la afinidad (Tabla 4). Ambos clones mostraron una elevada afinidad. Este ejemplo demuestra además que se puede obtener directa y sencillamente un conjunto de anticuerpos de alta afinidad utilizando el método del presente invento, en este caso a partir de una sola placa de microtitulación.

TABLA 4

Pocillo	k_a	k_d	K_D (pM)
C9	1,8 e6	6,3 e-5	35
D2	2,80 ± 0,01 e6	4,23 ± 0,14 e-5	15,1

Ejemplo 3

Separación por inmuoafinidad sobre un antígeno celularmente expresado (molécula coestimuladora de ratón)

Se inmunizaron conejos con cuatro inyecciones subcutáneas de una proteína de fusión de CD4 de rata-molécula coestimuladora de ratón a intervalos de tres semanas y se prepararon células B de sangre periférica en una fracción mononuclear sobre Lympholyte-Rabbit CL-5050 (Cedarlane Laboratories, Ltd.).

Se sembraron las células diana (células parentales de ovario de hámster chino o células que habían sido transfectadas con el gen para expresar la molécula coestimuladora de ratón) en los pocillos de una placa de microtitulación, en una cantidad de 3×10^4 células/pocillo, y se cultivaron durante la noche para producir una monocapa confluyente al 70%. Luego se fijaron las células con metanol al 80% y se bloquearon las placas con suero de ternera fetal al 10% en PBS. Se añadieron PBMCs de un conejo inmunizado en el equivalente de 3 ml de sangre a una placa y el equivalente de 0,3 ml de sangre a otra, y se dejó que se unieran durante 2 horas a 37°C antes de un lavado a fondo ($10 \times 200 \mu\text{l}$ /pocillo) para eliminar las células mononucleares y las células B que expresaban anticuerpos irrelevantes. Después del lavado final, se añadieron $200 \mu\text{l}$ de medio como en el Ejemplo 1, con TSN (3%) y células EL4.B5 (5×10^3 /pocillo), a las restantes células B que expresaban anticuerpos específicos, y se cultivaron las células durante 7 días. Los anticuerpos secretados a los sobrenadantes de los cultivos fueron explorados en cuanto a su capacidad para unirse a la fase sólida, la proteína de fusión de CD4-antígeno purificado, mediante un ELISA. El 50% de los pocillos de la placa con el equivalente de 3 ml de sangre eran positivos y el 6% de la placa del equivalente de 0,3 ml de sangre eran positivos (Figuras 8 y 9). Los sobrenadantes tomados de los cultivos en los que se había llevado a cabo una separación por inmuoafinidad sobre células CHO no transfectadas fallaron generalmente en cuanto a unirse al antígeno con sólo una excepción (Columnas 7-12).

Se seleccionaron ocho pocillos positivos y se llevó a cabo una PCR del modo descrito en el Ejemplo 1 para obtener las secuencias de regiones variables de anticuerpo. Los datos secuenciales de los ocho pocillos mostraron que se había obtenido clonalidad en un pocillo. En los otros pocillos, en los que se habían recuperado secuencias mixtas, se tomaron las secuencias que representaban la secuencia dominante en las mezclas y las secuencias de más de un pocillo que eran idénticas o muy similares, para un estudio adicional. La expresión transitoria de clones en células CHO y los ELISAs se llevaron a cabo del modo descrito en el Ejemplo 1. Se confirmó la expresión de IgG (Figura 10). Se halló que cuatro apareamientos de cadenas pesadas y ligeras eran capaces de unirse al antígeno como productos recombinantes (Figura 11).

Un análisis BIAcore™ mostró una unión de alta afinidad de los Clones 3 y 7 al antígeno, registrándose constantes de velocidad de disociación inmensurables, lo que sugería velocidades de disociación inferiores a $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Se determinó que la afinidad (K_D) del Clon 2 era 254 pM y que la afinidad del Clon 9 era 7 nM. Este ejemplo demuestra además que se puede obtener directa y sencillamente un conjunto de anticuerpos de alta afinidad utilizando el método del presente invento, teniendo dos de los anticuerpos una velocidad de disociación inferior a $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ en este caso.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un anticuerpo con una función deseada, método que comprende:

- a) poner una población de células B en contacto con una serie de recipientes unitarios a los que se ha unido un antígeno;
- b) separar de los recipientes unitarios aquellas células B que no se han unido al antígeno, mientras se conservan aquellas células B que se han unido al antígeno;
- c) cultivar una pluralidad de las células B unidas en aquellos recipientes unitarios en que han quedado retenidas, preferiblemente bajo unas condiciones adecuadas para multiplicación clonal;
- d) explorar el contenido de al menos un recipiente unitario para identificar por ello al menos un recipiente unitario positivo en cuanto a la presencia de células capaces de producir un anticuerpo con la función deseada; y
- e) obtener el anticuerpo deseado directa o indirectamente de dicho recipiente unitario.

2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la operación c) comprende cultivar las células bajo unas condiciones adecuadas para multiplicación clonal.

3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la operación d) comprende ensayar al menos un recipiente unitario en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos con la función deseada, explorando el sobrenadante de cultivo presente en el(los) recipiente(s) unitario(s).

4. Un método de acuerdo con la Reivindicación 3, en que se lleva a cabo un ensayo para identificar un recipiente unitario que es positivo en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos de alta afinidad hacia un antígeno de interés.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que, en la operación e), el anticuerpo deseado se obtiene de un recipiente unitario cuyo contenido es clonal.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que, en la operación e), el anticuerpo se obtiene de un recipiente unitario identificado como positivo en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos con la función deseada, cultivando las células presentes en el recipiente unitario o sus descendientes.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que, en la operación e), el anticuerpo se obtiene de un recipiente unitario identificado como positivo en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos con la función deseada, aislando los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo y haciendo que se expresen (o una versión modificada de los mismos) en una célula huésped.

8. Un método de acuerdo con la Reivindicación 7, en que el aislamiento de los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo comprende multiplicar los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo.

9. Un método de acuerdo con la Reivindicación 8, en que la multiplicación se lleva directamente a cabo sobre las células, o sus descendientes, que están presentes en un recipiente unitario identificado como positivo en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos con la función deseada.

10. Un método de acuerdo con la Reivindicación 9, en que hay una operación de recuperación de ácido nucleico antes de la multiplicación.

11. Un método de acuerdo con la Reivindicación 8, 9 ó 10, en que la multiplicación se lleva a cabo utilizando el sobrenadante de cultivo de un recipiente unitario identificado como positivo en cuanto a la presencia de células que producen anticuerpos con la función deseada.

12. Un método de acuerdo con la Reivindicación 11, en que los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son aislados determinando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo (o partes del mismo) y deduciendo a partir de ella una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o partes del mismo.

13. Un método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 12, en que los genes que codifican el anticuerpo o partes del mismo son modificados antes de su expresión.

Figura 1

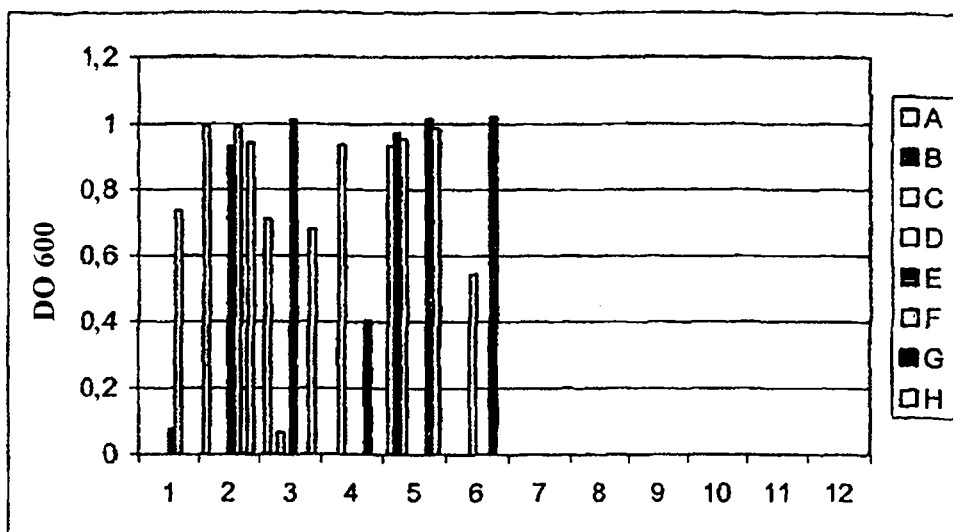


Figura 2

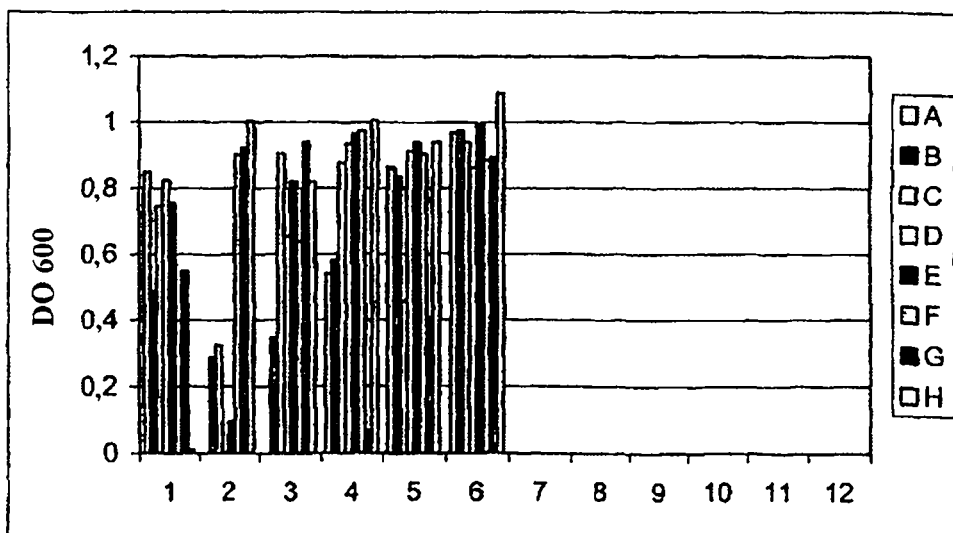


Figura 3

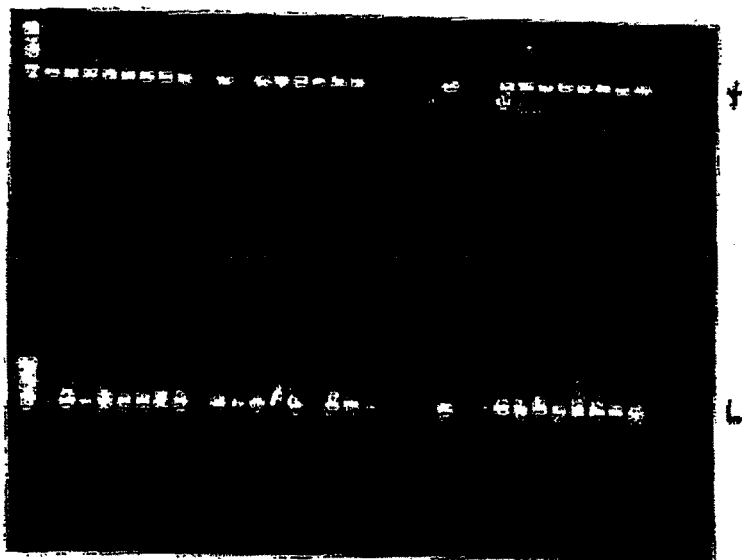


Figura 4

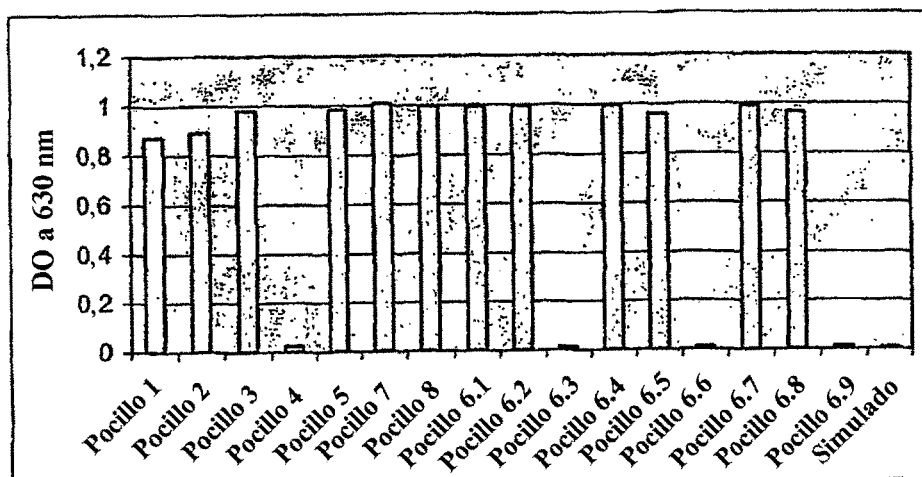


Figura 5

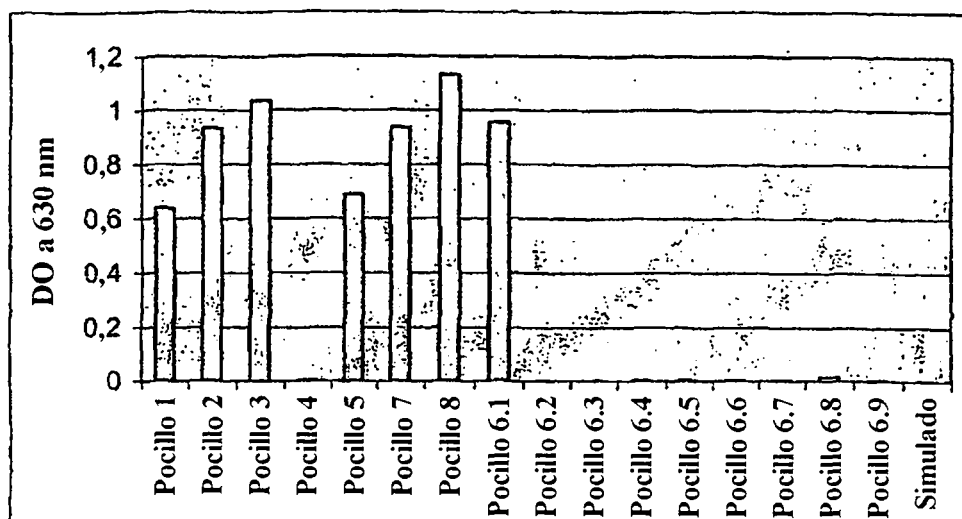


Figura 6A

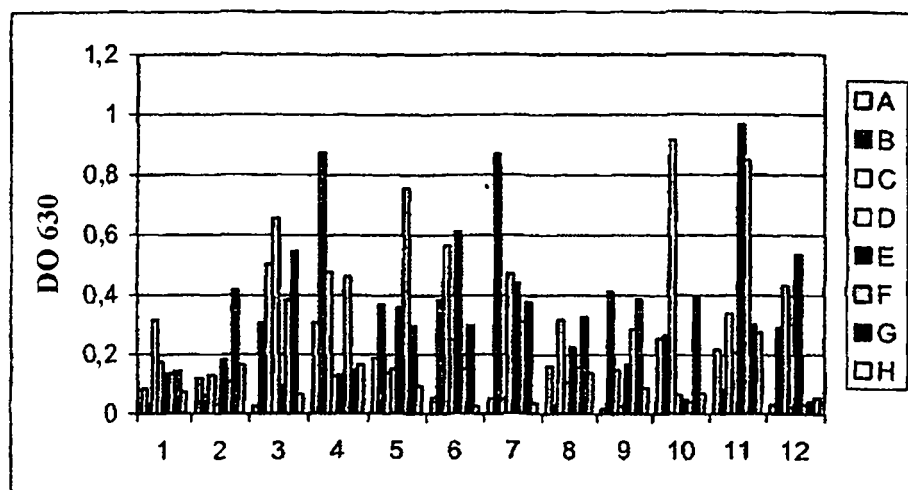


Figura 6B

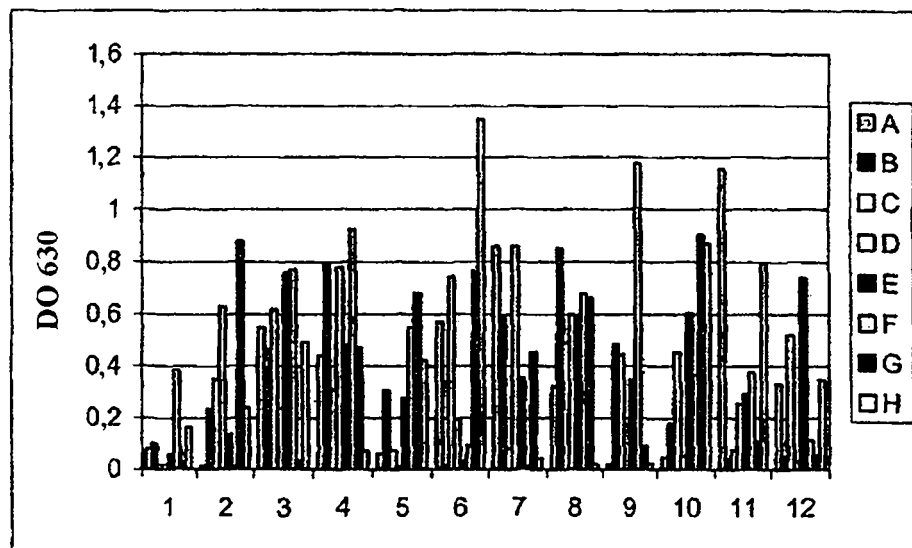


Figura 6C

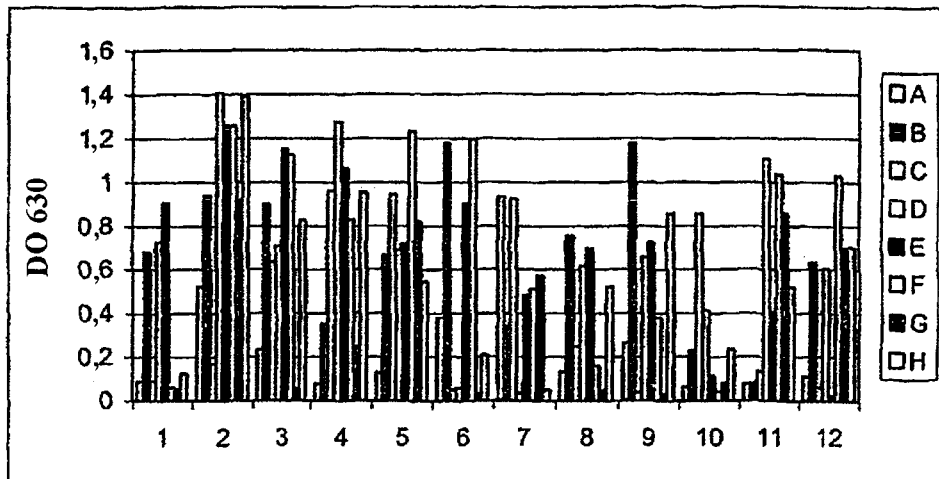


Figura 6D

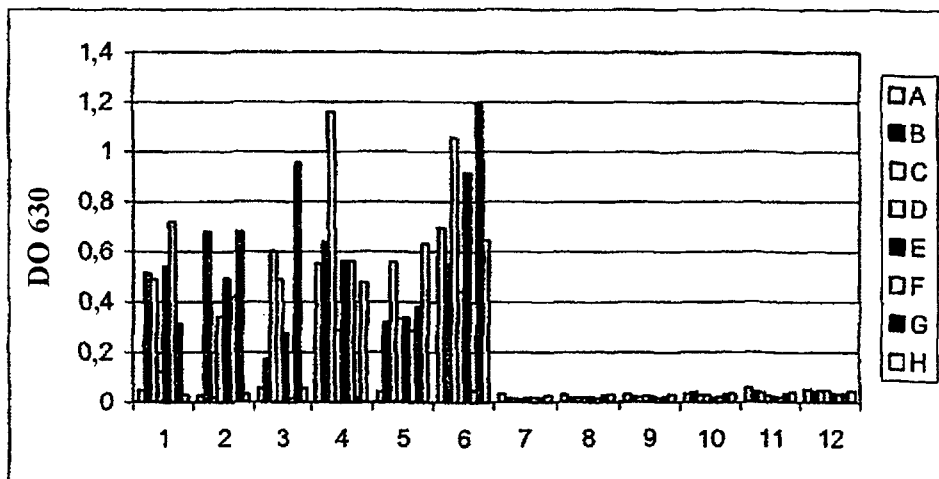


Figura 7A

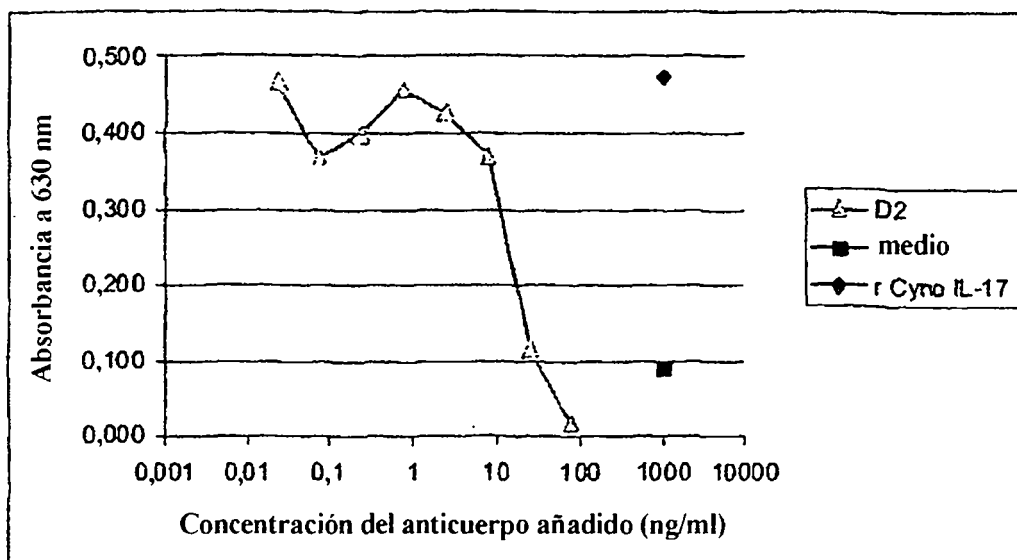


Figura 7B

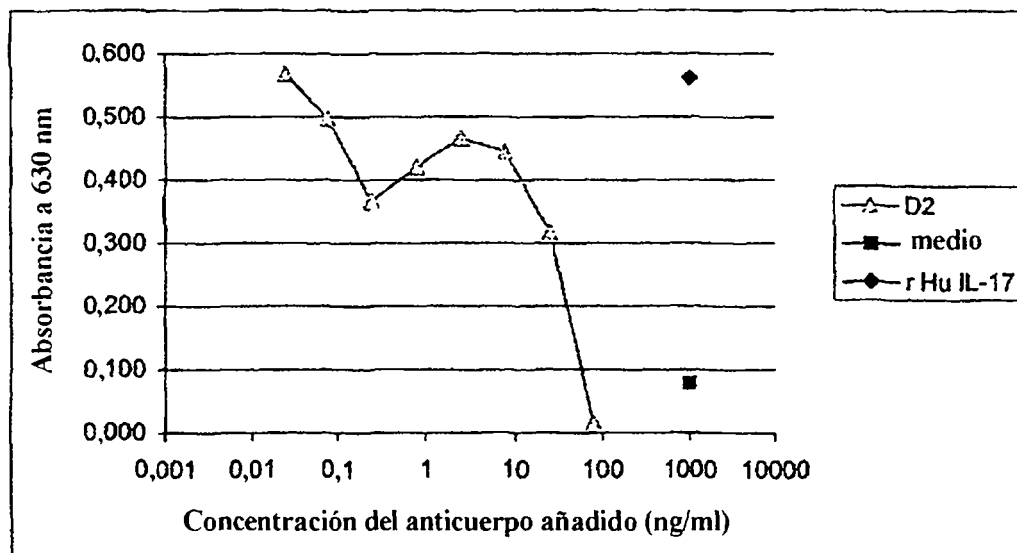


Figura 8

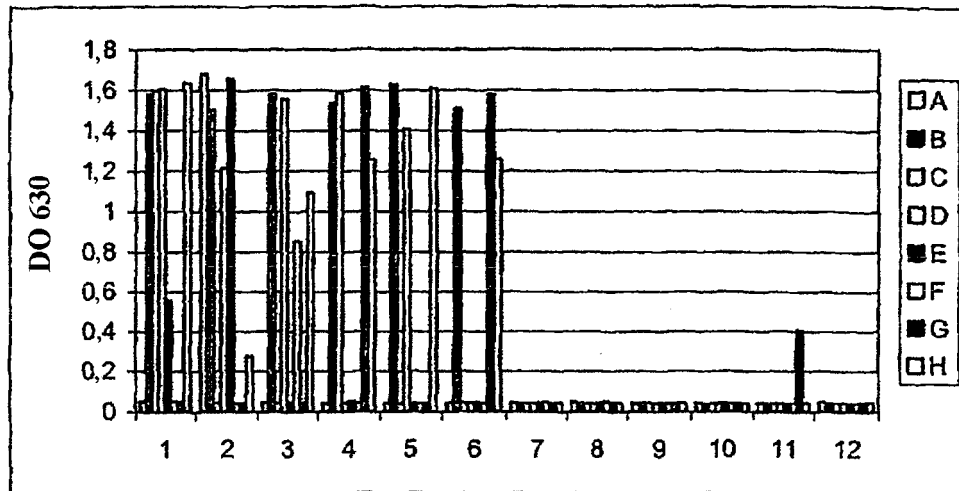


Figura 9

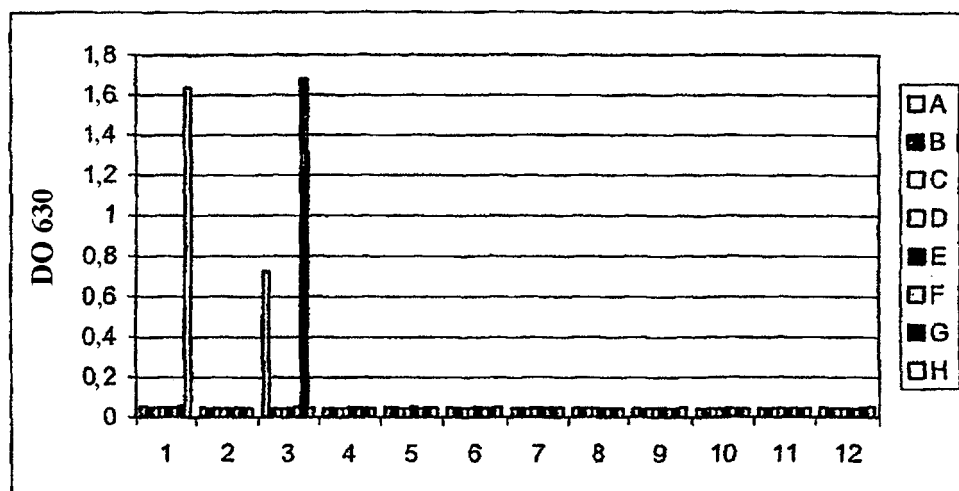


Figura 10

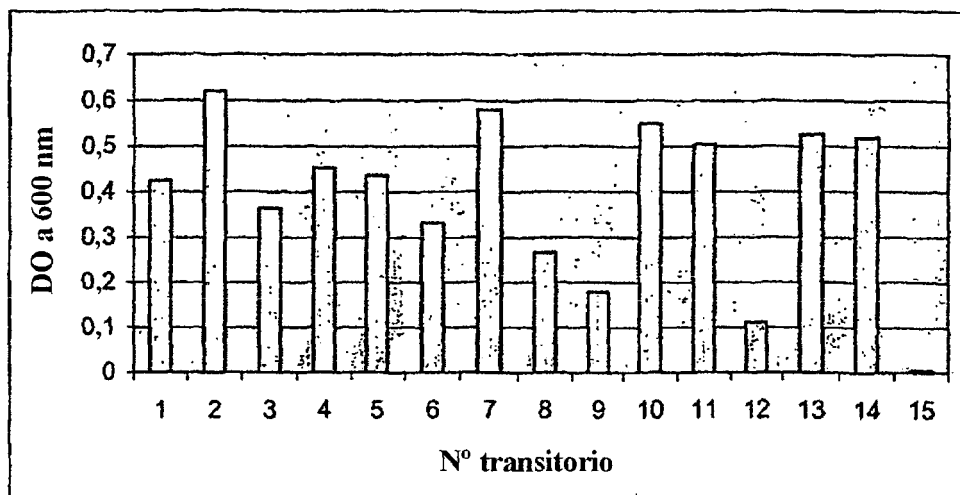


Figura 11

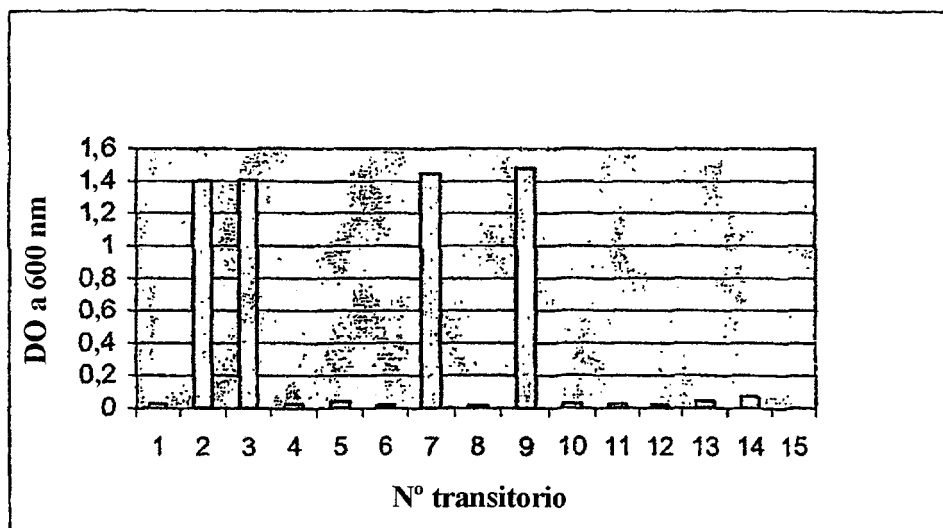


Figura 12

