



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 214**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
C12N 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03725333 .3**
86 Fecha de presentación : **17.04.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1506235**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales.**

30 Prioridad: **17.04.2002 GB 0208817**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73 Titular/es: **EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY
Postfach 10 22 09
69012 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Sawyer, Alan, Michael y
De Masi, Federico**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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 producción de anticuerpos monoclonales.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para producir anticuerpos monoclonales. En particular, la invención se refiere a procedimientos de alto rendimiento para producir anticuerpos monoclonales más rápidamente que por procedimientos convencionales.

10 El desarrollo de estirpes celulares productoras de anticuerpos monoclonales mediante fusiones somáticas de linfocitos B con células de mieloma fue descrito por vez primera por Kohler y Milstein hace más de 25 años (Kohler y Milstein, 1975). Desde entonces, los anticuerpos monoclonales han desempeñado un papel central en el crecimiento exponencial de nuestro conocimiento de la fisiología, bioquímica y genética humanas. Los anticuerpos monoclonales son herramientas versátiles y sensibles para detectar y localizar moléculas biológicas específicas. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse contra cualquier molécula de las células, lo que permite identificar, localizar y purificar esa molécula. En algunos casos, los anticuerpos monoclonales también ayudan a identificar la función de las moléculas a las que se unen.

15 También se descubrió rápidamente el potencial diagnóstico y terapéutico de los anticuerpos monoclonales cuando la técnica de los hibridomas permitió su desarrollo a mediados de los 70. Los anticuerpos monoclonales se han convertido en componentes clave en un gran abanico de pruebas de diagnóstico de laboratorio clínico. Además, un gran número de fármacos autorizados contienen anticuerpos monoclonales y un gran número de fármacos que se están desarrollando son anticuerpos monoclonales. El uso clínico de los anticuerpos monoclonales ha sido mejorado mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales quiméricos y totalmente humanizados que minimizan los efectos secundarios en los pacientes.

20 Sin embargo, a pesar del papel central de los anticuerpos monoclonales en estos desarrollos de la medicina y la biología molecular, el procedimiento para producir y cribar anticuerpos monoclonales ha cambiado poco desde que fue desarrollado por primera vez por Kohler y Milstein a mediados de los 70. La estrategia que se emplea más habitualmente para producir un anticuerpo monoclonal contra un antígeno requiere una serie de inmunizaciones de ratones o ratas con un antígeno durante el transcurso de varias semanas para potenciar la activación y proliferación de linfocitos B maduros que producen anticuerpos específicos de antígeno. Generalmente se inmunizan múltiples ratones y se analizan periódicamente para determinar la presencia de valoraciones de inmunoglobulinas relevantes en suero antes de la fusión somática. Tras la fusión, los sobrenadantes de los hibridomas se criban usando inmunoensayos para identificar los anticuerpos monoclonales con una especificidad alta por el antígeno. El intervalo de tiempo necesario para desarrollar un anticuerpo monoclonal usando esta estrategia es generalmente de 3 a 9 meses.

25 El documento WO 96/33735 describe un procedimiento de producir un anticuerpo humano inmunizando un animal transgénico no humano con un antígeno contra el que se desea producir el anticuerpo. El animal transgénico no humano ha sido modificado para que produzca linfocitos B que segregan anticuerpos humanos en lugar de anticuerpos endógenos. Tras la inmunización, se obtienen los linfocitos B a partir del bazo del animal y se immortalizan usando la técnica de Kohler y Milstein para producir los hibridomas. Puede usarse un ELISA en sandwich en el que el anticuerpo monoclonal del sobrenadante del hibridoma se une al antígeno y a una región constante contra el anticuerpo humano para confirmar que el anticuerpo es humano. Templin y cols., (Trends in Biotechnology, 2002, 20:160) se refiere a las ventajas y limitaciones teóricas de los sistemas de la tecnología de los genochips y, en particular del cambiante uso de los genochips proteínicos en los procedimientos de diagnóstico y de investigación de genomas y proteomas.

30 El desarrollo de la técnica RIMMS (estrategia de inmunización en múltiples sitios repetitiva) ha permitido que las fusiones somáticas se hagan sólo 8-14 días tras la iniciación de la inmunización (Kilpatrick y cols., 1997). Después, los sobrenadantes de los hibridomas producidos pueden cribarse usando inmunoensayos estándar, lo que permite aislar un anticuerpo monoclonal contra un antígeno específico mucho más rápido.

35 Sin embargo, incluso usando la RIMMS, la producción y el cribado de los anticuerpos monoclonales contra un gran número de antígenos diferentes requiere un tiempo y recursos considerables. Al irse descubriendo más y más proteínas nuevas, existe la necesidad de procedimientos más rápidos y eficaces para producir y cribar anticuerpos monoclonales contra estas proteínas, para permitir su caracterización ulterior.

Sumario de la invención

40 Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento de alto rendimiento para producir una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato diferente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) introducir una pluralidad de antígenos candidato en un animal o animales;
- 45 b) recuperar las células que producen anticuerpos de dicho animal o animales y convertir estas células en una suspensión monocelular;
- c) generar estirpes celulares immortalizadas a partir de dicha suspensión monocelular;

d) cribar el sobrenadante de dichas estirpes celulares immortalizadas con un microchip de proteínas sobre el que se presentan los antígenos candidato; y

e) seleccionar anticuerpos monoclonales, que se unen a dichos antígenos candidato.

5

El procedimiento de la invención presenta ventajas considerables sobre los procedimientos de producir anticuerpos monoclonales que están disponibles actualmente. Tal como se ha analizado ya, los actuales procedimientos para producir anticuerpos monoclonales contra más de un antígeno requieren unos protocolos de inmunización y aislamiento laboriosos para cada antígeno individual. Por el contrario, en el procedimiento de la invención, pueden inyectarse múltiples antígenos al animal, lo que daría como resultado la producción simultánea de anticuerpos monoclonales contra antígenos múltiples y el aumento de la velocidad y eficacia de la producción de anticuerpos monoclonales. El uso de un microchip de proteínas en el procedimiento de la invención acelera el proceso de cribado para detectar anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno o antígenos que se han inyectado al animal. Además, el microchip de proteínas es más sensible que los ensayos de cribado convencionales, tales como los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), consiguiendo una velocidad de detección mejorada para las células de hibridoma de secreción lenta que no se encontrarían usando los procedimientos de cribado convencionales. Además, el uso de un microchip de proteínas en el procedimiento de la invención permite cribar cada sobrenadante varias veces contra un antígeno y usa únicamente una fracción de la cantidad de antígeno necesaria para un único cribado en un ensayo de cribado convencional tal como un ELISA. Por ejemplo, cada sobrenadante puede cribarse por duplicado, triplicado o cuadruplicado contra un antígeno.

20

El animal en la etapa a) del procedimiento de la invención puede ser cualquier animal mamífero no humano. Preferiblemente, el animal es un ratón, rata, conejo, hámster o cobaya. Preferiblemente, el animal es un ratón.

25

El antígeno candidato de la etapa a) es preferiblemente un antígeno candidato purificado. En el animal puede introducirse o un antígeno candidato purificado o una mezcla de antígenos candidato purificados. Por “antígeno candidato purificado” se quiere decir que el antígeno es una preparación homogénea de antígeno que está sustancialmente libre de cualesquiera otros componentes. Por “una mezcla de antígenos candidato” se quiere decir que en la composición que se usa para la inmunización hay más de un antígeno purificado presente, pero que la preparación está libre de componentes contaminantes contra los que no se pretende provocar la producción de anticuerpos. Por ejemplo, aunque se usen procedimientos convencionales, puede inmunizarse a un animal con antígenos múltiples simplemente inmunizando con tejido homogenizado, dicha inmunización no representa la inmunización con antígenos candidato purificados tal como se define en la presente memoria, dado que los antígenos estarían contaminados con restos celulares.

30

Puede introducirse cualquier número de antígenos candidato purificados en el animal. Preferiblemente, se introduce más de un antígeno candidato purificado en el animal. Por ejemplo pueden introducirse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más de 50 antígenos candidato purificados en el animal. Los antígenos pueden introducirse de forma simultánea, en el sentido de que estén todos mezclados. De forma alternativa, los antígenos pueden introducirse por separado uno después del otro. La introducción de antígenos diferentes puede estar separada por un periodo de tiempo de días. Preferiblemente, el periodo que separa la introducción de los diferentes antígenos es inferior a 48 horas, preferiblemente inferior a 24 horas. Preferiblemente, el procedimiento de introducción supone la inyección del/de los antígeno(s) en el animal.

40

Con el término “antígeno candidato” se quiere decir cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal cuando ese antígeno candidato se introduce en el animal. El término por lo tanto incluye sustancias proteínicas y sustancias no proteínicas.

45

Las sustancias proteínicas que son antígenos incluyen proteínas y sus derivados, tales como glicoproteínas, lipoproteínas y nucleoproteínas y péptidos. Los fragmentos de dichas sustancias proteínicas también están incluidos dentro del término “antígeno”. Preferiblemente, dichos fragmentos están formados o comprenden determinantes antigénicos. Las sustancias no proteínicas que son antígenos incluyen polisacáridos, lipopolisacáridos y ácidos nucleicos. En particular, el término “antígeno” incluye moléculas de ácido nucleico que inducen una respuesta inmunitaria contra las proteínas que codifican. Los fragmentos de dichas sustancias no proteínicas están también incluidos en el término “antígeno”. El término “antígeno” incluye sustancias proteínicas o no proteínicas unidas a un vehículo que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria, tales como lípidos o haptenos a los que se confiere capacidad antigénica cuando se unen a un vehículo. Los antígenos de la invención pueden ser sustancias naturales o pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

55

El antígeno es preferiblemente una sustancia proteínica o una molécula de ácido nucleico. Cuando el antígeno purificado es una sustancia proteínica, puede introducirse solo o en forma de una proteína de fusión. En particular, la invención estipula que el antígeno puede estar en forma de una proteína de fusión expresada sobre la superficie de un virión recombinante, que se inyecta al animal. La producción de dichos viriones recombinantes usando una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno proteínico, se describe en Lindley y cols., 2000.

60

Puede usarse cualquier combinación de antígenos purificados. Al animal se le pueden inyectar sólo antígenos proteínicos, sólo antígenos no proteínicos o una mezcla de ambos. De acuerdo con una realización de la invención, los antígenos purificados son todos proteínicos. Los antígenos purificados pueden ser fragmentos derivados de la misma proteína o de proteínas diferentes. Los antígenos purificados pueden ser viriones recombinantes derivados de una

65

adenoteca de ADNc, donde cada virión recombinante expresa una proteína codificada por un ADNc de la adenoteca en su superficie.

De acuerdo con una realización adicional, la invención estipula que se introducen múltiples antígenos purificados en el animal en forma de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas contra las que se desea producir anticuerpos monoclonales. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas de ADN, moléculas de ADNc o moléculas de ARN. Preferiblemente, en este aspecto de la invención, puede introducirse una adenoteca de ADNc en el animal. Por lo tanto es posible inyectar al animal moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de identidad desconocida y, tal como se describe más adelante, pueden usarse chips de células para aislar un anticuerpo contra la proteína, lo que a su vez permite purificar la proteína.

Cuando el antígeno purificado es una molécula de ácido nucleico, preferiblemente consiste o comprende una secuencia de ADN, ADNc o ARN que codifica una proteína contra la que se debe inducir una respuesta inmunitaria. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico desnuda o puede estar en forma de un vector.

El vector puede ser un vector vírico, preferiblemente a un vector retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), virus herpes, vector alfavirus o cualquier otro vector adecuado tal como será obvio para el lector experto. De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico puede estar en forma de un vector no vírico, preferiblemente un vector plasmídico. Se conocen muchos de dichos vectores y están documentados en la técnica (véase, por ejemplo, Fernández J. M. y Hoeffler J. P. en *Gene expression systems. Using nature for the art of expression* Ed. Academic Press, San Diego, Londres, Boston, Nueva York, Sydney, Tokio, Toronto, 1998). Tales vectores pueden incorporar además secuencias reguladoras tales como potenciadores, promotores, sitios de unión de ribosomas y señales de terminación en las regiones 5' y 3' sin traducir de los genes, que son necesarias para asegurarse de que la secuencia codificadora se transcribe y traduce de forma apropiada.

De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico puede estar en forma de un ADN condensado policatiónico ligado o no ligado a adenovirus inactivados, véase por ejemplo Curiel (1992) *Hum Gene Ther* 3: 147-154, o ADN ligado a ligandos, véase por ejemplo Wu (1989) *J Biol Chem* 264: 16985-16987. La molécula de ácido nucleico también puede estar en forma de perlas de látex recubiertas con ADN. De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico puede estar encapsulada en liposomas tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 y EP-524,968. SA 91 (24): 11581-11585.

El antígeno puede introducirse en el animal por cualquier medio adecuado. Preferiblemente, el procedimiento de introducción supone la inyección. Los animales pueden inmunizarse con el antígeno o antígenos purificados por vía intraesplénica, intravenosa, intradérmica o subcutánea o cualquier otro medio adecuado. Los animales pueden inmunizarse con el antígeno o antígenos purificados por más de una de estas vías. Por ejemplo, algún antígeno o antígenos purificados pueden inyectarse por vía intraperitoneal y el resto por vía subcutánea. Los medios de inyección dependerán del antígeno o antígenos que se inyecten. Por ejemplo, en el caso de la inyección con una molécula de ácido nucleico, puede usarse una pistola de partículas para la transferencia de genes portátil, tal como se describe en el documento US 5.149.655 para inyectar la molécula de ácido nucleico.

En el caso de un antígeno proteínico, la dosis de cada antígeno preferiblemente debería estar comprendida en el intervalo de entre 0,01 y 1000 microgramos.

Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende la etapa adicional de proporcionar al animal una dosis de refuerzo de algunos o todos los antígenos que se introducen en el animal prior antes de obtener las células que producen anticuerpos. El refuerzo puede administrarse a los animales 1-365 días después de la primera inyección. Preferiblemente, los animales reciben el refuerzo de 1 a 20 veces.

Preferiblemente, los protocolos de inmunización que se usan en la metodología de la presente invención son cortos cuando se usa más de un antígeno para evitar que un antígeno se vuelva inmunodominante. Preferiblemente, cuando el animal se inmuniza con más de un antígeno, se le inyecta un refuerzo de cada antígeno o un refuerzo combinado de más de un antígeno 3 días después de la primera inyección y un refuerzo adicional 5 días después de la inyección inicial, y el tejido esplénico o los nódulos linfáticos se extraen entre el día 6 y el día 15. Cuando se desee un protocolo de inmunización más largo, puede inyectarse al animal por ejemplo, un refuerzo de cada antígeno o un refuerzo combinado de más de un antígeno 21 días después de la primera inyección, extrayendo tejido esplénico o nódulos linfáticos el día 26.

La inmunización del animal puede realizarse con o sin vehículos farmacéuticos. Los vehículos adecuados son habitualmente macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotículas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivas. Tales vehículos son notorios para las personas de experiencia ordinaria en la técnica. Además, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). La inmunización del animal puede realizarse con o sin adyuvantes además de los vehículos farmacéuticos.

Los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo

(véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59TM (documento WO 90/14837; capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, editores Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5% (que opcionalmente contiene MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador; (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero bloqueado plurónico al 5% L 121, y thr-MDP o bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica o bien agitado en vórtice generando una emulsión con mayor tamaño de partícula y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana a partir del grupo constituido por monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM); (3) pueden usarse adyuvantes de saponinas, tales como QS21 o StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir de ellas entre otras los ISCOM (complejos inmunoestimuladores), ISCOM que pueden carecer de detergentes adicionales, como por ejemplo en el documento WO 00/07621; (4) Adyuvante completo de Freund (CFA) y Adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, por ejemplo interleucinas (por ejemplo IL1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO 99/44636) etc.), interferones (por ejemplo interferón γ), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforilípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo los documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alum cuando se usa con sacáridos de neumococos por ejemplo el documento WO 00/56358; (7) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo, con QS21 y/o con emulsiones de aceite en agua por ejemplo los documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman y cols., *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner y cols., *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis y cols., *J. Immunol.*, 1998, 160, 870-876; Chu y cols., *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford y cols., *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu y cols., *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224; Krieg y cols., *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman y cols., *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas y cols., *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery y cols., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern y cols., *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto y cols., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey y cols., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina y cols., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi y cols., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi y cols., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi y cols., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi y cols., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581) es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, opcionalmente usando 5-metilcitosina en lugar de citosina; (9) un polioxietiléneter o un éster de polioxietileno por ejemplo el documento WO 99/52549; (10) un éster de polioxietilensorbitan tensioactivo combinado con un octoxinol (documento WO 01/21207) o un polioxietilenalquiléter o un éster tensioactivo combinado con al menos un tensioactivo no iónico adicional por ejemplo un octoxinol (documento WO 01/21152); (11) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) (documento WO 00/62800); (12) un inmunoestimulante y una partícula de una sal metálica por ejemplo documento WO 00/23105; (13) una saponina y una emulsión de aceite en agua por ejemplo el documento WO 99/11241; (14) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) por ejemplo documento WO 98/57659; (15) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden usarse incluyen Montanide ISA 50, TiterMax de Hunter, y adyuvantes Gerbu.

Las células que producen anticuerpos preferidas para usar en la invención incluyen linfocitos B, linfocitos T y células madre. Estas células que producen anticuerpos para usar en la invención pueden obtenerse extrayendo cualesquiera componentes celulares adecuadas del sistema inmunitario del animal. Preferiblemente, las células que producen anticuerpos se obtienen del animal extrayendo el bazo, los nódulos linfáticos o la médula ósea o porciones de los mismos. Estos pueden convertirse en una suspensión monocelular de acuerdo con la etapa b) del procedimiento de la invención por cualquier medio adecuado. Preferiblemente, el tejido del bazo, los nódulos linfáticos o la médula ósea extraídos del animal se convierten en una suspensión monocelular por alteración mecánica o por digestión enzimática con proteasas. Los glóbulos rojos pueden extraerse de la suspensión celular mediante lisis hipotónica.

Preferiblemente, la estirpe celular inmortalizada que se especifica en la etapa c) del procedimiento de la invención es una estirpe celular de hibridoma producida por la fusión somática de las células de la suspensión monocelular con células de mieloma. Las células de la suspensión monocelular se fusionan con las células de mieloma con un fusógeno. Ejemplos de células de mieloma que pueden usarse incluyen SP2, NS1 y NS0. Preferiblemente, el fusógeno es PEG, un virus o un procedimiento de electrofusión (Zimmermann y cols. 1990).

Las células de hibridoma producidas por la fusión de la suspensión monocelular con las células de mieloma deberían ser cultivadas. Preferiblemente, las células de hibridoma se cultivan inicialmente en un medio selectivo, por ejemplo Azaserina hipoxantina o Hipoxantina aminopterina timidina, y después se transfieren a un medio no selectivo. Preferiblemente, las células de hibridoma se cultivan en medio selectivo durante 7 días y después se transfieren a un medio no selectivo durante 3 días. Esto asegura que la velocidad de crecimiento de las células aumente antes de la etapa de cribado. Preferiblemente, las etapas implicadas en la producción del hibridoma se realizan por medios robóticos para acelerar el proceso. Los Ejemplos describen un modo de realizar las etapas implicadas en la producción de hibridomas por medios robóticos.

De forma alternativa, la estirpe celular inmortalizada puede ser una estirpe celular generada mediante la infección de células de la suspensión monocelular con un virus inmortalizante. Preferiblemente, el virus inmortalizante es el virus de Epstein-Barr (véase, por ejemplo, Epstein Barr Virus Protocols, Editores Wilson y May, Humana Press; ISBN: 0896036901).

La etapa d) del procedimiento de la invención comprende el cribado del sobrenadante de la estirpe celular inmortalizada, preferiblemente una estirpe celular de hibridoma, con un microchip de proteínas que comprende un antígeno candidato con el que se inmunizó al animal. Tal como se usa en la presente memoria, el término “microchip de proteínas” se usa para englobar cualquier genochip formado por un medio de soporte al que se ha anclado un antígeno candidato.

Cuando se ha introducido más de un antígeno purificado en el animal, cada antígeno purificado puede presentarse en una posición diferente del microchip de proteínas, preferiblemente en una posición predeterminada. Cada posición del microchip de proteínas puede así presentar un antígeno diferente. De forma alternativa, el mismo antígeno puede anclarse a cada posición en una fila o una columna de un microchip de proteínas con un antígeno diferente en cada fila o columna. En algunos casos, puede ser deseable, incluso cuando el animal ha sido inmunizado con más de un antígeno purificado, usar un chip diferente para cada antígeno. Un microchip de proteínas puede tener un gran número, por ejemplo entre 1 y 1000 antígenos purificados, anclados en posiciones predeterminadas sobre un chip.

En el procedimiento de invención puede usarse cualquier tipo de microchips de proteínas conocido en la técnica. Por ejemplo, el microchip de proteínas puede ser una platina de cristal a la que se ancla el antígeno o antígenos purificados. Cuando sólo se está analizando un antígeno, dicha platina puede prepararse simplemente recubriendo portas de microscopio de cristal con aminosilano (Ansorge, Faulstich), añadiendo una solución que contiene el antígeno al porta y secando. Las platinas recubiertas con aminosilano pueden obtenerse de Telechem y Pierce para recubrir con el antígeno purificado. Preferiblemente, dicha platina de cristal puede recubrirse con (6-aminohexil)aminosilano.

Otros tipos de microchips de proteínas que pueden usarse en el procedimiento de la invención incluyen una capa de gel de 3D (Arkenov y cols, 2000) y chips de micropocillos. Tal como será obvio para el lector experto, los tipos de microchips de proteínas que todavía no se han desarrollado pero que se desarrollarán en el futuro pueden muy bien demostrar ser adecuados para usar de acuerdo con la presente invención.

El término “chip de proteínas” también incluye genochips de células que expresan ADNc definidos (Ziauddin y cols, 2001) que se denominan en la presente memoria “chips de células”. En esta técnica, se cultivan células de mamífero en una platina de cristal con impresiones de diferentes ADNc en posiciones definidas. Las células que crecen en las posiciones impresas captan y expresan los ADNc. Los chips de células son particularmente útiles cuando se ha inyectado al animal un ADNc o una genoteca de ADNc o un virión o los viriones recombinantes producidos a partir de una genoteca de ADNc, tal como se describe anteriormente. En tales casos, las proteínas codificadas por las secuencias de ADNc pueden no estar aisladas. Al inyectar al animal ADNc que codifican las proteínas o viriones recombinantes que expresan los ADNc, es posible producir anticuerpos monoclonales contra las proteínas expresadas por los ADNc. Si los mismos ADNc se expresan usando un chip de células, estos anticuerpos se unirán y la unión puede detectarse tal como se describe más adelante. Siempre que haya disponible una secuencia de ácido nucleico que codifique la proteína, la invención de este modo permite detectar y aislar un anticuerpo monoclonal contra esa proteína que puede usarse para purificar la proteína misma.

Para la selección de anticuerpos o para la selección de estirpes celulares inmortalizadas que producen dichos anticuerpos, el sobrenadante de la estirpe celular o de las estirpes celulares inmortalizadas se siembra en gotas sobre el chip de proteínas o chips de proteínas en posiciones definidas sobre el chip. La siembra en gotas de los sobrenadantes preferiblemente se realiza por medios robóticos, por ejemplo con un Genemachines Ominigrid arrayer usando agujas Telechem. Preferiblemente, los sobrenadantes sembrados en gotas sobre el microchip de proteínas o los chips de proteínas contienen glicerol para minimizar el secado y fijado de los anticuerpos sobre la platina. Por ejemplo, puede usarse de 0 a 99,9% de glicerol. Después se lava el chip para eliminar el sobrenadante no unido. En este momento, cualquier anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular inmortalizada y por lo tanto presente en el sobrenadante puede estar unido a un antígeno del chip.

Al usar diferentes condiciones de elución, el procedimiento permite cuantificar aproximadamente la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal por su complementario. Los agentes de elución que pueden usarse incluyen agentes caotrópicos, por ejemplo clorhidrato de guanidina o urea a concentraciones de entre 10 μ molar y 8 molar o etilenglicol en una solución acuosa de 0,01% a 100% p/v. Las eluciones también pueden realizarse usando soluciones acuosas o no acuosas de glicina a concentraciones de entre 0,01 molar y una solución saturada (preferiblemente 200 mM), a un pH de entre pH 9 y pH 1, preferiblemente a pH 3,2. Las eluciones a pH elevado pueden realizarse usando soluciones acuosas o no acuosas de trietilamina entre 1 μ molar y una solución saturada, preferiblemente 100 mM, a un pH de entre pH 8 y pH 13, preferiblemente a pH 11,5.

La etapa e) del procedimiento de la invención supone la selección de un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno. Preferiblemente, esta etapa incorpora una etapa de detección, por ejemplo añadiendo un marcador que se unirá al anticuerpo monoclonal unido e indicará su presencia. Preferiblemente, el marcador está marcado por ejemplo con un marcador enzimático o fluorescente que permite detectar su presencia. Por ejemplo, el marcador puede ser proteína A marcada o proteína G marcada. La proteína A o la proteína G pueden estar marcadas con un marcador fluorescente por ejemplo Cy3 o Cy5. De forma alternativa, la proteína A o la proteína G pueden estar marcadas con un marcador enzimático por ejemplo biotina, cuya presencia puede detectarse por la unión de estreptavidina o avidina marcadas.

Preferiblemente, el marcador es un anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Preferiblemente este anticuerpo está marcado con un marcador por ejemplo marcadores enzimáticos o fluorescentes. Preferiblemente este anticuerpo está marcado con marcadores fluorescentes ya que esto permite usar los aparatos desarrollados para escanear los chips de ADN en la detección.

Preferiblemente, la etapa de detectar un anticuerpo monoclonal unido al antígeno comprende además isotipar los anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, esta etapa de detectar e isotipar los anticuerpos monoclonales comprende añadir anticuerpos contra inmunoglobulinas específicos de isotipo a dicho microchip de proteínas, en el que cada anticuerpo contra una inmunoglobulina que tiene una especificidad de isotipo diferente tiene un marcador diferente, y detectar la presencia de dichos marcadores. Este procedimiento permite detectar simultáneamente el anticuerpo monoclonal y determinar su isotipo.

Se apreciará que el procedimiento puede emplear tantos anticuerpos contra inmunoglobulinas específicos de isotipo como isotipos de anticuerpos haya en el animal que ha sido inmunizado. Por ejemplo, si se ha inyectado un antígeno a un mamífero, por ejemplo a un ratón, la etapa de detectar e isotipar los anticuerpos monoclonales unidos al antígeno puede comprender añadir un anticuerpo contra IgA marcado con un primer marcador, y/o un anticuerpo contra IgD marcado con un segundo marcador, y/o un anticuerpo contra IgE marcado con un tercer marcador, y/o un anticuerpo contra IgG1 marcado con un cuarto marcador, y/o un anticuerpo contra IgG2a marcado con un quinto marcador, y/o un anticuerpo contra IgG2b marcado con un sexto marcador, y/o un anticuerpo contra IgG3 marcado con un séptimo marcador, y/o un anticuerpo contra IgG4 marcado con un octavo marcador, y/o un anticuerpo contra IgM marcado con un noveno marcador. De forma alternativa, la etapa de detectar e isotipar anticuerpos monoclonales unidos al antígeno puede comprender añadir anticuerpos contra inmunoglobulinas específicos de isotipo que se unen a un subconjunto de isotipos posibles. Preferiblemente, los anticuerpos contra inmunoglobulinas específicos de isotipo comprenden un anticuerpo contra IgM marcado con un primer marcador y un anticuerpo contra IgG marcado con un segundo marcador. Preferiblemente, los marcadores son marcadores fluorescentes.

La detección del marcador indica la presencia de un anticuerpo monoclonal unido a un antígeno y preferiblemente se realiza por medios robóticos. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, la detección del marcador y por lo tanto de la presencia del anticuerpo monoclonal puede realizarse usando los aparatos disponibles para escanear microchips de proteínas. Por ejemplo, el escaneo de los chips puede realizarse con un escáner GenePix 4000B 5 (Axon Instruments, Inc.) o con un escáner Tecan LS200 o LS400. El escaneo puede realizarse con entre 1 y 4 láser y combinaciones de filtros para permitir la visualización de múltiples marcadores fluorescentes. Preferiblemente, la visualización de los múltiples marcadores fluorescentes se realiza de forma simultánea aunque puede realizarse secuencialmente.

Las imágenes pueden obtenerse y analizarse utilizando programas adecuados por ejemplo el programa GenePix Pro (Axon Instruments, Inc.), el programa Chipskipper (Schwager, Ansorge) o el programa Tecan LS200 o LS400.

Para asegurarse de que la detección de un anticuerpo monoclonal es fiable, el procedimiento de cribado preferiblemente emplea diversos controles. Por ejemplo, en el caso de un microchip de proteínas recubierto con un antígeno, no sólo se sembrarán en gotas los sobrenadantes producidos por las estirpes celulares inmortalizadas mediante el procedimiento de la invención sobre el microchip de proteínas sino también los controles positivos y negativos.

Los controles positivos pueden ser anticuerpos monoclonales analizados anteriormente o de policlonales disponibles comercialmente. De forma alternativa, los controles positivos pueden estar formados por suero diluido o sin diluir previamente obtenido del ratón inmunizado bien después de un periodo adecuado después del refuerzo o en el momento en el que se sacrifica al animal para recoger la fuente de los linfocitos B.

Los controles negativos pueden ser sobrenadantes simulados en posiciones definidas. Otro nivel de control se determina por el hecho de que cada sobrenadante se criba contra varios antígenos. Se considera que las señales obtenidas sólo contra un antígeno potencialmente son sobrenadantes que contienen un anticuerpo monoclonal.

Las señales positivas del microchip de proteínas pueden rastrearse hasta identificar una estirpe celular inmortalizada particular, lo que permite aislar el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la etapa e) del procedimiento de la invención. Después puede realizarse una caracterización ulterior de los anticuerpos identificados.

Los procedimientos para realizar una caracterización adicional del anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, la etapa adicional de determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales identificados. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal identificado mediante el procedimiento de la invención puede usarse para escanear un segundo microchip de proteínas que tiene un gran número de proteínas diferentes ancladas sobre su superficie para establecer si el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un antígeno. Pueden usarse los procedimientos de escaneo descritos anteriormente en la identificación inicial de la proteína para detectar su especificidad. La especificidad y afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante el procedimiento de la invención pueden caracterizarse además alterando las concentraciones de antígeno sobre los microchips de proteínas o alterando la restricción de las condiciones de elución, tal como se describe anteriormente.

De acuerdo con una realización adicional del primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir un banco de estirpes celulares inmortalizadas que producen una pluralidad de anticuerpos monoclonales de interés, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) introducir una pluralidad de antígenos candidato en un animal o animales;

b) recuperar las células que producen anticuerpos de dicho animal o animales y convertir estas células en una suspensión monocelular;

c) generar estirpes celulares inmortalizadas a partir de dicha suspensión monocelular;

d) cribar el sobrenadante de dichas estirpes celulares inmortalizadas con un microchip de proteínas sobre el que se presentan los antígenos candidato; y

e) seleccionar las estirpes celulares inmortalizadas, que producen sobrenadantes que contienen anticuerpos que se unen a dichos antígenos candidato.

Las estirpes celulares inmortalizadas producidas mediante un procedimiento así son de gran utilidad en la generación de anticuerpos con especificidades diseñadas a medida.

Los antígenos candidato preferiblemente son antígenos candidato purificados, tal como se describe anteriormente. Los procedimientos adecuados para introducir los antígenos candidato en el animal, recuperar las células que producen anticuerpos, generar estirpes celulares inmortalizadas y cribar los sobrenadantes de las estirpes celulares inmortalizadas se describen anteriormente.

Los procedimientos de la técnica anterior suponen procedimientos laboriosos y que requieren mucho tiempo para generar y cribar un anticuerpo monoclonal contra un único antígeno. Por el contrario, este procedimiento permite la generación y el cribado de alto rendimiento de anticuerpos monoclonales contra una pluralidad de antígenos de forma simultánea. El uso de un microchip de proteínas para realizar el cribado de alto rendimiento de los anticuerpos es más eficiente y más exacto que el uso de los ensayos convencionales y requiere menos antígeno candidato.

Preferiblemente, la etapa e) de esta realización comprende además el isotipado de los anticuerpos monoclonales, tal como se describe anteriormente. Esto proporciona una ventaja adicional sobre los procedimientos de la técnica anterior que no describen la detección e isotipado simultáneos de los anticuerpos monoclonales.

La invención proporciona anticuerpos monoclonales. La invención puede usarse también para generar un banco de anticuerpos por ejemplo con especificidades que engloban el proteoma completo de un organismo. Dicho banco de anticuerpos representa un aspecto adicional de la invención.

La invención proporciona también estirpes celulares inmortalizadas, preferiblemente estirpes celulares de hibridoma, que producen anticuerpos monoclonales. La invención también proporciona un banco de estirpes celulares inmortalizadas, preferiblemente un banco de estirpes celulares de hibridoma. La invención también puede usarse para generar un banco de estirpes celulares de hibridoma que, por ejemplo, produzca anticuerpos que engloban el proteoma completo de un organismo.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una pluralidad de anticuerpos monoclonales, que cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato purificado diferente, que comprende introducir una pluralidad de antígenos candidato purificados en un animal.

Preferiblemente, cada antígeno candidato se deriva de una fuente diferente. Con esto se quiere decir que cada antígeno se deriva de una proteína diferente, de un ácido nucleico diferente, etc. Se pretende que los procedimientos de producción de anticuerpos que suponen inyectar a un animal fragmentos diferentes de la misma proteína estén excluidos del alcance de este aspecto de la invención. Por ejemplo, los antígenos candidato purificados pueden ser todas sustancias proteínicas, con la condición de que no sean todos fragmentos de la misma proteína.

Este procedimiento tiene una ventaja con respecto a otros procedimientos que se describen en la técnica anterior porque permite la producción simultánea de más de un anticuerpo monoclonal, cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato purificado diferente.

Al animal se le pueden inyectar los antígenos candidato purificados usando cualquiera de las técnicas que se describen en la presente memoria. Por ejemplo, el procedimiento de este aspecto de la invención puede comprender además las etapas de recuperar células que producen anticuerpos por ejemplo linfocitos B, linfocitos T y células madre de un animal inmunizado, por ejemplo extrayendo tejido esplénico, nódulos linfáticos o médula ósea y convirtiéndolos en una suspensión monocelular. El procedimiento puede comprender además generar estirpes celulares inmortalizadas, preferiblemente estirpes celulares de hibridoma, a partir de las células de la suspensión monocelular. Preferiblemente, el procedimiento de este aspecto de la invención comprende estas etapas y además comprende las etapas de cribar los sobrenadantes de las estirpes celulares inmortalizadas, preferiblemente estirpes celulares de hibridoma, con un microchip de proteínas o microchips de proteínas sobre los que se presentan los antígenos candidato; y seleccionar los anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos y preferiblemente aislar los anticuerpos y/o las estirpes celulares inmortalizadas que producen los anticuerpos monoclonales. Los procedimientos adecuados para generar las estirpes celulares inmortalizadas y el posterior cribado de los sobrenadantes son iguales que los que se describen anteriormente relacionados con el procedimiento del primer aspecto de la invención. En particular, la etapa de detectar los anticuerpos

monoclonales puede suponer la detección simultánea de los anticuerpos monoclonales y la determinación de su isotipo, tal como se describe anteriormente. Además, el procedimiento puede comprender la caracterización ulterior de los anticuerpos monoclonales, tal como se describe anteriormente.

5 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal producido mediante un procedimiento de este aspecto de la invención. De nuevo, este aspecto de la invención puede usarse para generar un banco de anticuerpos, por ejemplo, que comprenda anticuerpos con especificidad por la proteína del proteoma completo de un organismo. Dicho banco de anticuerpos representa un aspecto adicional de la invención.

10 La invención también proporciona una estirpe celular inmortalizada, preferiblemente una estirpe celular de hibridoma, que produce un anticuerpo monoclonal tal como se describe anteriormente. La invención también puede usarse para generar un banco de estirpes celulares inmortalizadas, preferiblemente un banco de estirpes celulares de hibridoma, por ejemplo, que producen anticuerpos que engloban el proteoma completo de un organismo.

15 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, pueden generarse anticuerpos contra idiotipo que se unen a un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Los anticuerpos contra idiotipo son útiles porque tienen una región variable que imita la forma de la molécula contra la que se originó el anticuerpo original. Los anticuerpos contra idiotipo por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento como sustitutos para las moléculas contra las que se originó el anticuerpo original. Un anticuerpo contra idiotipo puede producirse empleando el procedimiento
20 del primer aspecto de la invención o del cuarto aspecto de la invención usando un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención como antígeno candidato purificado.

Por consiguiente, este aspecto de la invención proporciona un procedimiento de producir un anticuerpo contra
25 idiotipo que se une a un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento el uso de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el segundo aspecto de la invención como antígeno candidato purificado en un procedimiento del primer aspecto de la invención o del cuarto aspecto de la invención. La invención también incluye anticuerpos contra idiotipo generados mediante dichos procedimientos.

De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, pueden generarse anticuerpos contra anticuerpos contra idiotipo
30 que se unen a un anticuerpo contra idiotipo producido de acuerdo con el quinto aspecto de la invención. Dichos anticuerpos contra anticuerpos contra idiotipo pueden producirse empleando el procedimiento del primer aspecto de la invención o del cuarto aspecto de la invención usando un anticuerpo contra idiotipo tal como se describe anteriormente como antígeno candidato purificado. Este aspecto de la invención proporciona así un procedimiento de producir un anticuerpo contra anticuerpos contra idiotipo que se une a un anticuerpo contra idiotipo generado de acuerdo con el
35 quinto aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento el uso de un anticuerpo contra idiotipo tal como se describe anteriormente como antígeno candidato purificado en un procedimiento del primer aspecto de la invención o del cuarto aspecto de la invención.

A continuación se describirán diversos aspectos y realizaciones de la presente invención en más detalle a modo de
40 ejemplo. Se apreciará que pueden realizarse modificaciones de detalles sin separarse del alcance de la invención.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Imagen completa de un chip escaneado, donde los puntos verdes y rojos representan sobrenadantes con
45 producción positiva de IgG e IgM respectivamente. Las figuras aumentadas son para mostrar los detalles de áreas específicas del chip en las que se encuentran buenos puntos.

Figura 2: Comparación entre el análisis mediante chip y el cribado con ELISA. La primera imagen es una muestra
50 negativa ($I_a < 0,5$), mientras que las otras son positivas. I_c media: intensidad total media de los puntos de 3 chips. I_a : Contribución media del punto a la suma de las intensidades entre los tres chips (%).

Figura 3: Comparación de la contribución a la intensidad total (%) de los sobrenadantes de los cultivos cribados
55 mediante ELISA (■) o mediante análisis por chip (□) en base a la unión al antígeno B5 (Figura 3A). Los valores del ruido de fondo se muestran en la Figura 3B. Se muestran un número de sobrenadantes positivos identificados mediante análisis por chip y/o mediante ELISA.

Figura 4: Comparación de la contribución a la intensidad total (%) de los sobrenadantes de los cultivos cribados
60 mediante ELISA (■) o mediante análisis por chip (□) en base a la unión al antígeno B5 (Figura 4A). Los valores del ruido de fondo se muestran en la Figura 4B. Se muestra un único sobrenadante positivo identificado mediante análisis por chip y mediante ELISA.

Figura 5: Comparación de la contribución a la intensidad total (%) de los sobrenadantes de los cultivos cribados
65 mediante ELISA (■) o mediante análisis por chip (□) en base a la unión al antígeno Ket94/95 (Figura 5A). Los valores del ruido de fondo se muestran en la Figura 5B. Se muestran un número de sobrenadantes positivos identificados mediante análisis por chip y/o mediante ELISA.

Figura 6: Comparación de la contribución a la intensidad total (%) de los sobrenadantes de los cultivos cribados
mediante ELISA (■) o mediante análisis por chip (□) en base a la unión al antígeno Ket94/95 (Figura 6A). Los valores

del ruido de fondo se muestran en la Figura 6B. No se identificaron sobrenadantes positivos ni mediante ELISA ni mediante análisis por chip.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunización con 10 antígenos proteínicos

Inmunización

Se inyectaron 10 μ g de cada uno de 10 antígenos proteínicos en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un ratón Balb/c hembra de 8 semanas de edad por vía intraesplénica. El tercer día (día 3) se inyectó al ratón 1 μ g de cada uno de los 10 antígenos proteínicos en 100 μ l de PBS por vía intraperitoneal. El día 5, se inyectó al mismo ratón 0,1 μ g de cada uno de los mismos 10 antígenos proteínicos. El día 8 se sacrificó al ratón por luxación cervical y el bazo se extirpó y se introdujo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: Life Technologies Inc.).

Fusión

Todas las etapas se realizaron en condiciones estériles o asépticas en una campana de flujo laminar. El bazo se convirtió en una suspensión monocelular mediante alteración mecánica entre dos portas de microscopio de cristal con extremos esmerilados. La suspensión se filtró a un tubo de fondo cónico con código de barras de 50 ml (BD Falcon) a través de un colador de células de nylon de 70 μ m (BD Falcon) y se transfirió al sistema robótico.

Por separado, se cultivaron células de mieloma SP2 para la fusión (ATCC) durante cinco días antes de la fusión en HM20 (DMEM, suero bovino fetal definido al 20% (Hyclone Defined), L-glutamina 10 mM, gentamicina 50 μ M) y el día de la fusión se transfirieron a HM20/HCF/2xOPI (HM20 que contenía factor de clonación de hibridoma al 10 (Origen) y suplemento de clonación OPI al 2% (Sigma)) durante al menos una hora a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%.

Los códigos de barras se leyeron con un lector de códigos de barras y el tubo Falcon de 50 ml se cargó en el rotor mediante el brazo RoMa en el sistema Genesis Freedom (Tecan). El rotor se cargó en la centrifugadora a través de la plataforma de trabajo.

El tubo se centrifugó a 100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y el rotor se extrajo de la centrifugadora. El tubo se extrajo del rotor y el código de barras se leyó de nuevo para distinguirlo del tubo de equilibrado. Las células se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisado de eritrocitos Red Cell (Sigma) durante 9 minutos a temperatura ambiente. Se añadió HM20 hasta 50 ml y el tubo se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a temperatura ambiente sin freno. La solución sobrenadante se aspiró para desecharla y las células se resuspendieron en DMEM precalentado a 37°C. Las células se lavaron dos veces más mediante etapas de centrifugación y resuspensión. Se pipetearon 50 μ l de la suspensión celular por medios robóticos a un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Las células se contaron usando una cámara de recuento hemocitométrico.

De forma simultánea, las células SP2 se lavaron tres veces de forma similar y se separó una alícuota similar (50 μ l) a un tubo de 1,5 ml para el recuento hemocitométrico. Las células de mieloma SP2 y las células esplénicas se mezclaron en una relación de 1:5 (SP2:esplénicas) y de nuevo se centrifugaron a 100 x g durante 10 minutos sin freno.

La solución de sobrenadante se aspiró completamente para desecharla y se pipeteó polietilenglicol 1500 en HEPES 50% (PEG: Roche Molecular Biochemicals) previamente calentado a 37°C por medios robóticos de forma suave y progresiva durante 1 minuto con rotación a 450 rpm en una agitadora Te-shake (Tecan AG) para asegurar un mezclado homogéneo. La mezcla de células y PEG se incubó durante 1 minuto a 37°C con agitación suave. De forma similar se añadió 1 ml de DMEM durante 1 minuto a 37°C con agitación similar. La mezcla se incubó durante 1 minuto a 37°C con agitación suave. Se añadió 1 ml más de DMEM por medios robóticos durante 1 minuto a 37°C con agitación suave y se incubó de forma similar durante otro minuto. Se añadieron 7 ml de HM20 por medios robóticos durante 3 minutos a 37°C con agitación suave. El tubo después se centrifugó a 90 x g durante 5 minutos con freno. El sobrenadante se aspiró para desecharlo y el sedimento se resuspendió en 20 ml de HM20/HCF/OPI/AH (HM20/HCF/OPI más Azaserina Hipoxantina al 10% (Sigma)).

El tubo cónico se introdujo otra vez en la plataforma de trabajo del robot y se aspiró la suspensión celular posterior a la fusión mediante 8 puntas de pipeta de boca ancha del brazo robótico para manejo de líquidos. Después se pipetearon 200 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos profundos (Greiner Masterblock).

La placa de pocillos profundos se transfirió después por medios robóticos a un robot pipeteador de 96 pocillos TeMo integrado sobre la plataforma de trabajo Genesis y se usó como placa fuente para plaquear las 20 placas de cultivo tisular de 96 pocillos estériles.

Después la mezcla posterior a la fusión se plaquéó por medios robóticos en 20 placas estériles de 96 pocillos (Nunc) proporcionadas por un carrusel unido e integrado al robot a 100 μ l/pocillo y se transfirió por medios robóticos a una incubadora integrada a 37°C con CO₂ al 10% a través del airlock integrado. Las placas se almacenaron en un carrusel que contenía la incubadora.

Cultivo celular

El tercer día después de la fusión, las células se transportaron por medios robóticos de la incubadora a la plataforma de trabajo y se añadieron otros 100 μ l de HM20/HCF/OPI/AH por medios robóticos. Después las placas se devolvieron a la incubadora por medios robóticos.

El día 7 las placas se transportaron de nuevo de forma similar desde la incubadora a la plataforma de trabajo y se aspiraron 200 μ l/pocillo de los sobrenadantes de los cultivos para desecharlos y se sustituyeron por 150 μ l de HM20/HCF fresco.

El día 11, las placas se transportaron de nuevo a la plataforma de trabajo por medios robóticos y se recogieron 30 μ l de sobrenadante de cada pocillo (Temo head: Tecan Inc.) y se transfirieron a placas de 384 pocillos proporcionadas a la plataforma de trabajo mediante un apilador de placas de carrusel (Tecan Inc.).

Cribado mediante los genochips

Portas de cristal recubiertos de aminosilano se recubrieron de forma homogénea con antígeno purificado vertiendo 40 μ l de ddH₂O que contenían 1-5 μ g de antígeno y se cubrieron con un cubreobjetos de 22 x 60 mm durante 60 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Las placas recubiertas se enjuagaron brevemente en PBS y se bloquearon durante 60 minutos en leche al 5% en PBS, Tween al 0,1%, después se lavaron durante 10 minutos en PBS. Los chips después se secaron mediante centrifugación durante 10 segundos a 2000 rpm.

Los sobrenadantes de los cultivos se consolidaron en placas de 384 pocillos usando un robot Beckman Biomek FX.

Los sobrenadantes de los cultivos se imprimieron de uno en uno sobre tres portas recubiertos de antígeno idénticos, a una densidad de 9600 puntos por chip y un tamaño de gota de ~120 μ l usando una impresora de genochips GeneMachines OmniGrid.

Los genochips se incubaron en una cámara húmeda durante 60 minutos, a temperatura ambiente y después se lavaron 5 veces durante 5 minutos en PBS con Tween al 0,1% (PBST).

Se diluyeron 40 μ l de anticuerpos específicos de cabra contra IgG de ratón conjugados con Cy3 y anticuerpos específicos de cabra contra IgM de ratón conjugados con Cy5 1:1000 en PBST, se mezclaron y se aplicaron uniformemente a los chips y se cubrieron con cubreobjetos de 22 x 60 mm y se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después los chips se lavaron 2 veces durante 10 minutos en PBST, 2 veces durante 10 minutos en PBS y 1 vez durante 10 minutos en ddH₂O. Los chips se secaron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 segundos.

Selección de los positivos

Se escanearon los chips con un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments), a una resolución de 10 μ m.pixel⁻¹. Los voltajes de PMT eran de 540 V y 610 V, para los canales de Cy3 y Cy5 respectivamente. Ambos láser se ajustaron a una intensidad del 100%. A cada chip escaneado se le asignó una gradilla ajustada y se analizaron todos los puntos mediante el GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments).

Todos los chips se analizaron mediante el programa GenePix Pro 3.0 y para cada chip los presentes inventores recogieron la información correspondiente a la intensidad corregida (I_c) de cada punto (mediana de las intensidades - ruido de fondo), para los canales Cy3 y Cy5. A partir de estos datos, los presentes inventores obtuvieron, para

cada chip, la contribución de cada punto a la intensidad corregida total de cada canal $\left(\frac{I_c}{\sum_1^{9600} I_c} \right) \times 100$.

Se promediaron los tres valores de cada canal para cada punto y esta Intensidad corregida media (I_a) se usó para el análisis final del conjunto de datos. Los presentes inventores consideraron como muestras "con probabilidad de ser positivas" las que tenían un valor superior al 0,5% y como "positivos seguros" todas las muestras que mostraban un valor superior a 1,5%.

Procesamiento posterior al cribado

Las células de los pocillos positivos se resuspendieron en el pocillo y se transfirieron 20 μ l a una placa de 96 pocillos profundos que previamente contenían 1,5 ml de HM20/HCF y se devolvieron a la incubadora durante 48 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

Se transfirieron 1,4 ml de sobrenadante de cada cultivo a otra placa de pocillos profundos y el resto de los 100 μ l se usó para resuspender las células que después se transfirieron a un vial de congelación que contenía suero bovino fetal al 90% y DMSO al 10% (Sigma) y se transfirieron a -80°C durante 2 horas y a partir de ahí a un almacén de nitrógeno líquido. Después, el sobrenadante del cultivo se usó para la evaluación y caracterización ulterior del anticuerpo monoclonal generado.

Resultados

Los resultados del cribado mediante los genochips se muestran en la Figura 1. Esta Figura demuestra que se detectaron sobre el porta un número de anticuerpos monoclonales positivos que se unían a los antígenos candidato. Los puntos verdes son anticuerpos monoclonales IgG que se unen a los antígenos candidato mientras que los puntos rojos son anticuerpos monoclonales IgM que se unen a los antígenos candidato. La Figura 1 así demuestra que el procedimiento de la invención puede usarse para identificar de forma simultánea los anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos candidato y los isotipos de esos anticuerpos monoclonales.

Cuando se realizó un experimento comparativo usando ELISA en lugar de un microchip de proteínas, un número de anticuerpos monoclonales identificados como que se unían a antígenos candidato en el cribado mediante los genochips no se identificaron como que se unían a antígenos candidato usando el ELISA, como se muestra en la Figura 2 (véase la comparación de los resultados de los genochips con los resultados de los ELISA). Un sobrenadante que se encontró que era negativo usando el cribado con genochips (I_a : 0,234), se encontró también que era negativo usando ELISA. Sin embargo, de los cuatro sobrenadantes que se encontró que eran positivos usando el cribado mediante genochips (I_a : 5,18, 1,96, 3,64 y 2,02), sólo dos se encontró que eran positivos usando ELISA (véase la Figura 2). Es importante observar cómo los sobrenadantes que dieron negativo en el experimento de ELISA realmente pueden ser muestras positivas según se detectó mediante la estrategia más exacta y sensible del genochip.

*Ejemplo 2**Inmunización con nueve antígenos**Inmunización*

A un ratón se le inyectaron 25 μ l de nueve antígenos, entre otros 25 μ g de una fusión de los antígenos B5 y Ket94/95, donde cada antígeno estaba mezclado con 10 μ g de ADN de CpG y se adsorbieron sobre adyuvante alum (Imject Alum de Pierce). La mitad de cada antígeno se administró por vía intraperitoneal y la mitad por vía subcutánea.

Se inyectó un refuerzo al ratón 21 días después de 10 μ g de ADN de CpG y se adsorbió sobre adyuvante alum, la mitad del cual se administró por vía intraperitoneal y la mitad por vía subcutánea.

Cinco días después del refuerzo, se extirpó el bazo.

Fusión y cultivo celular

Las fusiones y el cultivo celular se realizaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

Cribado mediante los genochips para determinar los anticuerpos contra B5 y Ket94/95

Un porta de cristal con aminosilano se recubrió de forma homogénea con B5 purificado vertiendo 40 μ l de ddH₂O que contenía 5 μ g de B5 purificado y cubriendo con un cubre de 22 x 60 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se usó el mismo procedimiento para producir un porta con aminosilano recubierto homogéneamente con Ket94/95 purificado.

Los portas recubiertos se enjuagaron, bloquearon, lavaron y secaron tal como se describe en el Ejemplo 1, pero se usó BSA al 3% en PBS en lugar de leche al 5% en PBS para bloquear el porta.

Los sobrenadantes de los cultivos se consolidaron en placas de 384 pocillos, tal como se describe en el Ejemplo 1 y se imprimieron por triplicado sobre el porta recubierto con B5 y el porta se recubrió con Ket94/95 a una densidad de aproximadamente 16000 puntos por chip y un tamaño de punto de ~150 μ m usando una impresora de genochips Microgrid II 610 (ApogentDiscoveries).

Los genochips se incubaron y se aplicaron anticuerpos específicos de cabra contra IgG de ratón conjugados con Cy3 y anticuerpos específicos de cabra contra IgM de ratón conjugados con Cy5 a los chips tal como se describe en el Ejemplo 1.

Selección de los positivos

Los chips se escanearon usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. Se calculó la intensidad corregida media (I_a) para cada conjunto de sobrenadantes de los cultivos triplicados.

Comparación entre el cribado mediante los genochips y mediante ELISA

Se realizó un experimento comparativo en el que se comprobó cada sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Cada sobrenadante de cultivo se añadió a un pocillo que contenía 200 μg de antígeno B5 o de Ket94/95 y se detectó la presencia de un anticuerpo monoclonal que se unía al antígeno del sobrenadante del cultivo usando un ELISA convencional.

Se necesitó una semana para cribar 5376 sobrenadantes de los cultivos usando los ELISA, y se obtuvieron 5376 resultados, uno para cada sobrenadante. Por el contrario, se tardó 48 horas en cribar los mismos 5376 sobrenadantes de los cultivos por triplicado usando genochips, y se produjeron 16128 resultados, lo que demuestra la eficacia del cribado mediante genochips comparado con el ELISA.

Además, sólo se necesitaron 5 μg de antígeno B5 y 5 μg de Ket94/95 para realizar el cribado mediante los genochips, 5 μg de antígeno por chip. Por el contrario, se necesitaron 96 μg de antígeno para cada placa de ELISA y cinco placas de ELISA para cribar cada antígeno. El cribado mediante ELISA por lo tanto fue significativamente más costoso y requirió más tiempo que el cribado mediante genochips.

Los datos obtenidos para cada placa de ELISA se normalizaron proporcionando una contribución porcentual a la intensidad total para cada sobrenadante de cultivo. Las intensidades replicadas medias para los mismos sobrenadantes de los cultivos obtenidos mediante el cribado mediante genochips se normalizaron también permitiendo la comparación con los datos del ELISA.

Cuando se cribaron los sobrenadantes de los cultivos usando ELISA para la unión de los anticuerpos monoclonales a B5, se identificaron 53 sobrenadantes positivos en cinco placas de ELISA. El cribado de los mismos sobrenadantes de los cultivos usando el cribado mediante genochips identificó 48 sobrenadantes positivos, el 90,57% de los sobrenadantes identificados por ELISA. El cribado mediante genochips también identificó 4 positivos nuevos que no fueron identificados mediante ELISA.

Cuando se cribaron los sobrenadantes de los cultivos usando ELISA para la unión de los anticuerpos monoclonales que se unían a Ket94/95, se identificaron 15 sobrenadantes positivos en una única placa de ELISA. El cribado de los mismos sobrenadantes de los cultivos usando el cribado mediante genochips identificó 13 sobrenadantes positivos, el 88,66% de los sobrenadantes positivos identificados mediante ELISA. El cribado mediante genochips también identificó 8 positivos nuevos que no se identificaron mediante ELISA.

A partir de estos resultados queda claro que el cribado mediante genochips es al menos tan eficaz como el ELISA para identificar anticuerpos monoclonales que se unen a un antígeno específico. De hecho, la identificación de los sobrenadantes positivos no identificados mediante ELISA sugiere que el cribado mediante genochips es más sensible que el ELISA. Además, el cribado mediante genochips presentaba la ventaja principal de que permitía la determinación simultánea del isotipo IgG o IgM de los anticuerpos monoclonales identificados.

La Figura 3A muestra los valores normalizados de la contribución porcentual a la intensidad total para cada sobrenadante de cultivo en una placa de ELISA (■) que contiene muestras positivas que se unen a B5 comparados con los valores normalizados de la contribución porcentual para los mismos sobrenadantes de los cultivos obtenidos mediante el cribado mediante genochips de un porta recubierto de B5 (□). La Figura 3B muestra el nivel de ruido de fondo en estos experimentos. Puede observarse que los sobrenadantes positivos mostraron una mayor contribución porcentual a la intensidad total usando el cribado mediante genochips comparado con el ELISA. Como consecuencia, se observó una mayor diferencia entre el ruido de fondo y un sobrenadante positivo en el cribado mediante genochips comparado con el ELISA, lo que permitió identificar los sobrenadantes positivos más fácilmente y con mayor exactitud.

La Figura 4A compara los valores normalizados de la contribución porcentual a la intensidad total para cada sobrenadante de cultivo en una placa de ELISA (■) que contiene una única muestra positiva que se une a B5 comparados con los valores normalizados de la contribución porcentual para los mismos sobrenadantes de los cultivos obtenidos mediante el cribado mediante genochips de un porta recubierto de B5 (□). En la Figura 4B se muestra el nivel de ruido de fondo y puede observarse que la muestra positiva pudo detectarse más fácilmente por encima del nivel de ruido de fondo usando el cribado mediante genochips comparado con el ELISA.

La Figura 5A compara los valores normalizados de la contribución porcentual a la intensidad total para cada sobrenadante de cultivo de la placa de ELISA que se encontró que contenía sobrenadantes positivos que se unían a KET94/95 (■) comparados con los valores normalizados de la contribución porcentual para los mismos sobrenadantes de los cultivos obtenidos mediante el cribado mediante genochips en un porta recubierto con KET94/95 (□). Los sobrenadantes positivos pudieron detectarse más fácilmente por encima del nivel de ruido de fondo usando el cribado mediante genochips comparado con el ELISA, como se muestra en la Figura 5B.

La Figura 6A compara los datos obtenidos a partir de una placa de ELISA (■) en la que no se obtuvieron sobrenadantes positivos con datos obtenidos usando el cribado mediante genochips (□) de los mismos sobrenadantes de los cultivos. Como se muestra en la Figura 6B, las lecturas en ambos casos se debían al ruido de fondo.

Estos resultados demuestran que el procedimiento de la invención puede usarse para identificar de forma simultánea anticuerpos monoclonales contra más de un antígeno. El uso del cribado mediante genochips en el procedimiento de la invención es más rápido, más barato y más exacto que el uso de los procedimientos convencionales de cribado de anticuerpos, por ejemplo el ELISA

Referencias

Kilpatrick y cols (1997) *Hybridoma* 16: 381-389 **Kohler G, Milstein C** (1975) *Nature* 7: 256: 485-7 **Lindley** y cols (2000) *J Immunol Methods* 234: 123-135.

Ziaudin J, Sabatini D (2001) *Nature* 411: 107-110 **Zimmermann U.** (1990) *J. Immunol. Methods* 6 de noviembre; 134(1): 43-50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de alto rendimiento para producir una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato diferente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) introducir una pluralidad de antígenos candidato purificados en un animal no humano o animales no humanos;
- b) recuperar las células que producen anticuerpos de dicho animal o animales y convertir estas células en una suspensión monocelular;
- c) generar estirpes celulares inmortalizadas a partir de dicha suspensión monocelular;
- d) cribar los sobrenadantes de dichas estirpes celulares inmortalizadas con un microchip de proteínas sobre el que se presentan los antígenos candidato; y
- e) seleccionar anticuerpos monoclonales que se unen a dichos antígenos candidato.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho animal es un ratón, una rata, una cobaya o un conejo.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que se introducen entre dos y cincuenta antígenos candidato purificados diferentes en el animal o animales.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que se introducen entre 0,001 y 1000 microgramos de cada antígeno en el animal o animales.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la etapa adicional de proporcionar al animal o animales una dosis de refuerzo de algunos o todos los antígenos que se introdujeron en el animal o animales antes de extraer las células que producen anticuerpos.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células que producen anticuerpos son linfocitos B, linfocitos T o células madre.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células que producen anticuerpos se obtienen mediante extracción de tejido del bazo, nódulos linfáticos o médula ósea del animal o animales.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la estirpe celular inmortalizada es una estirpe celular de hibridoma producida mediante fusión somática de las células de la suspensión monocelular a células de mieloma.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho chip de proteínas es un simple portaobjetos, un chip de capa de gel de 3D, un chip de micropocillos o un chip de células.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa de detectar los anticuerpos monoclonales unidos a los antígenos comprende además isotipar los anticuerpos monoclonales.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha etapa de detectar e isotipar los anticuerpos monoclonales comprende añadir anticuerpos contra inmunoglobulinas específicos de isotipo a dicho chip de proteínas, en el que cada anticuerpo contra inmunoglobulina que tiene una especificidad de isotipo diferente tiene un marcador diferente, y detectar la presencia de dichos marcadores.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que además comprende evaluar la especificidad con la que cada anticuerpo monoclonal aislado se une a un antígeno usando un chip de proteínas que comprende dicho antígeno.

13. Un procedimiento de identificar una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato diferente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) cribar el sobrenadante de las estirpes celulares inmortalizadas contra uno o más microchips de proteínas sobre los que se presentan los antígenos candidato; y
- b) seleccionar como dichos anticuerpos monoclonales, los anticuerpos que se unen a dichos antígenos candidato,

caracterizándose dicho procedimiento porque dichas estirpes celulares inmortalizadas se generan a partir de una única suspensión de células que producen anticuerpos que producen anticuerpos contra una pluralidad de antígenos.

ES 2 288 214 T3

14. Un procedimiento de producir un banco de estirpes celulares inmortalizadas que producen una pluralidad de anticuerpos monoclonales de interés, cada uno de los cuales se une a un antígeno candidato diferente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 a) introducir una pluralidad de antígenos candidato en un animal no humano o animales no humanos;
- b) recuperar las células que producen anticuerpos de dicho animal o animales y convertir estas células en una suspensión monocelular;
- 10 c) generar estirpes celulares inmortalizadas a partir de dicha suspensión monocelular;
- d) cribar el sobrenadante de dichas estirpes celulares inmortalizadas con un microchip de proteínas sobre el que se presentan los antígenos candidato; y
- 15 e) seleccionar como estirpes celulares, aquellas que producen sobrenadantes que contienen anticuerpos que se unen a dichos antígenos candidato.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

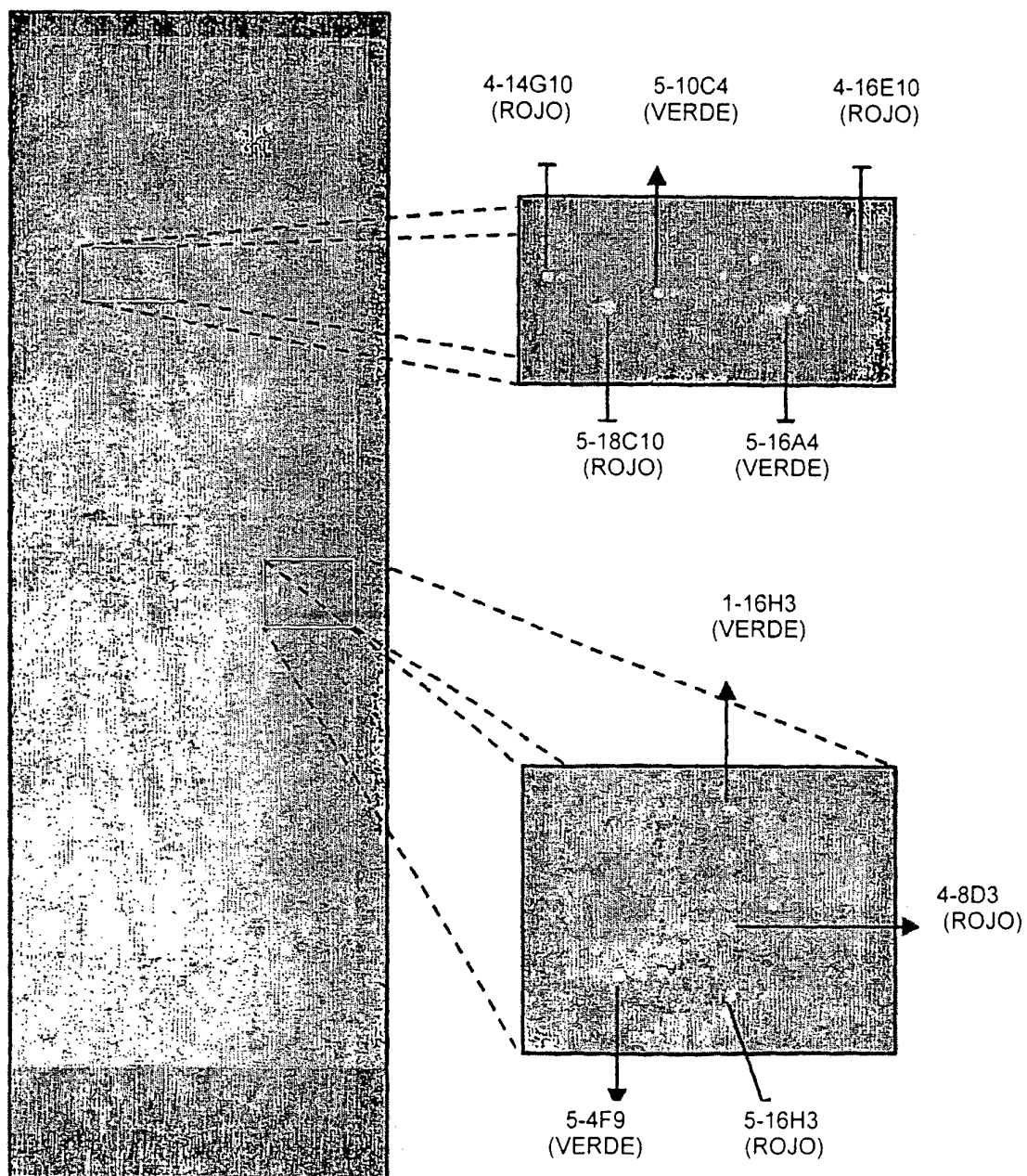


FIG. 2

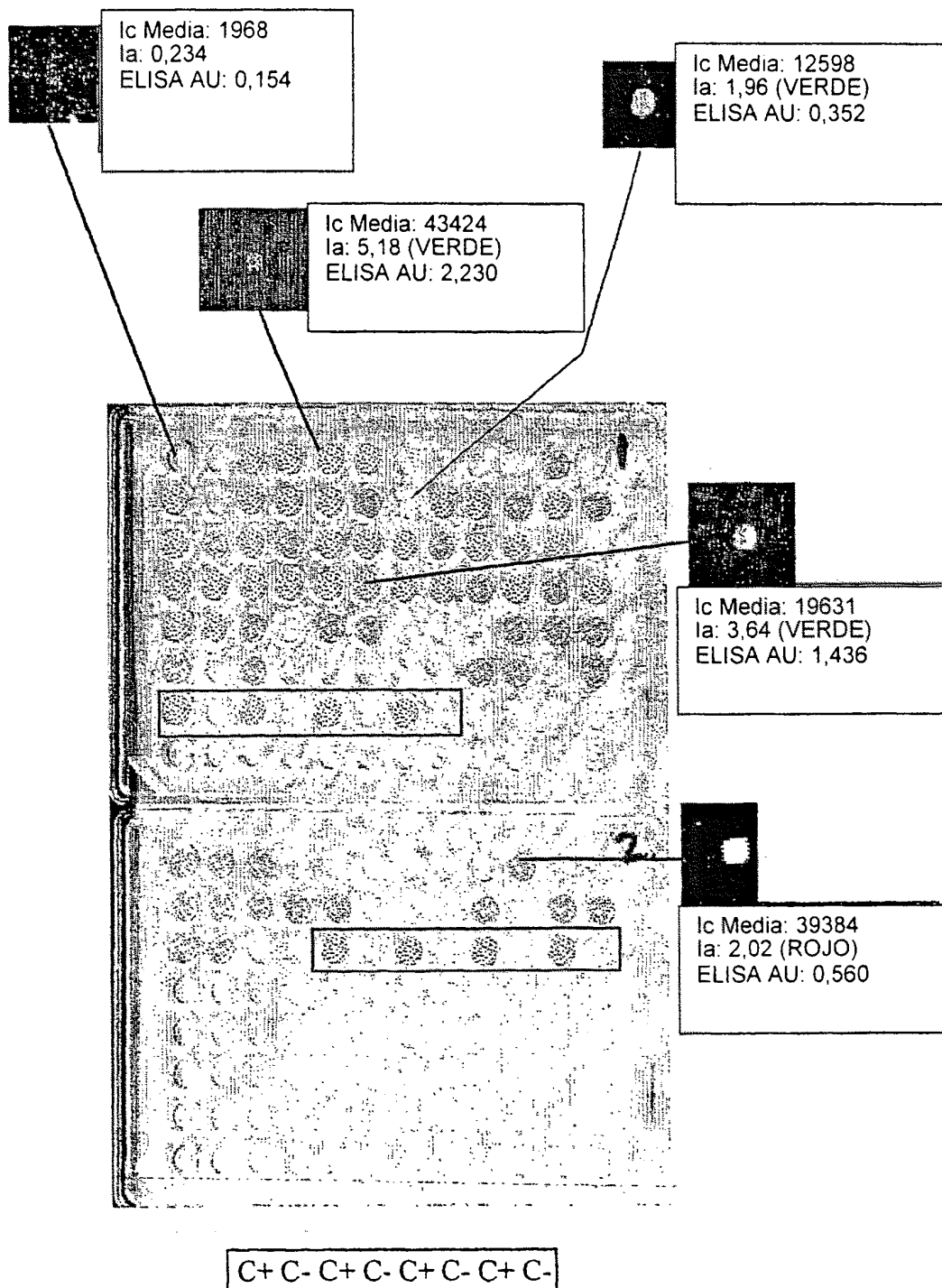


FIG. 3A
Clon B5 1B6 (Datos normalizados)

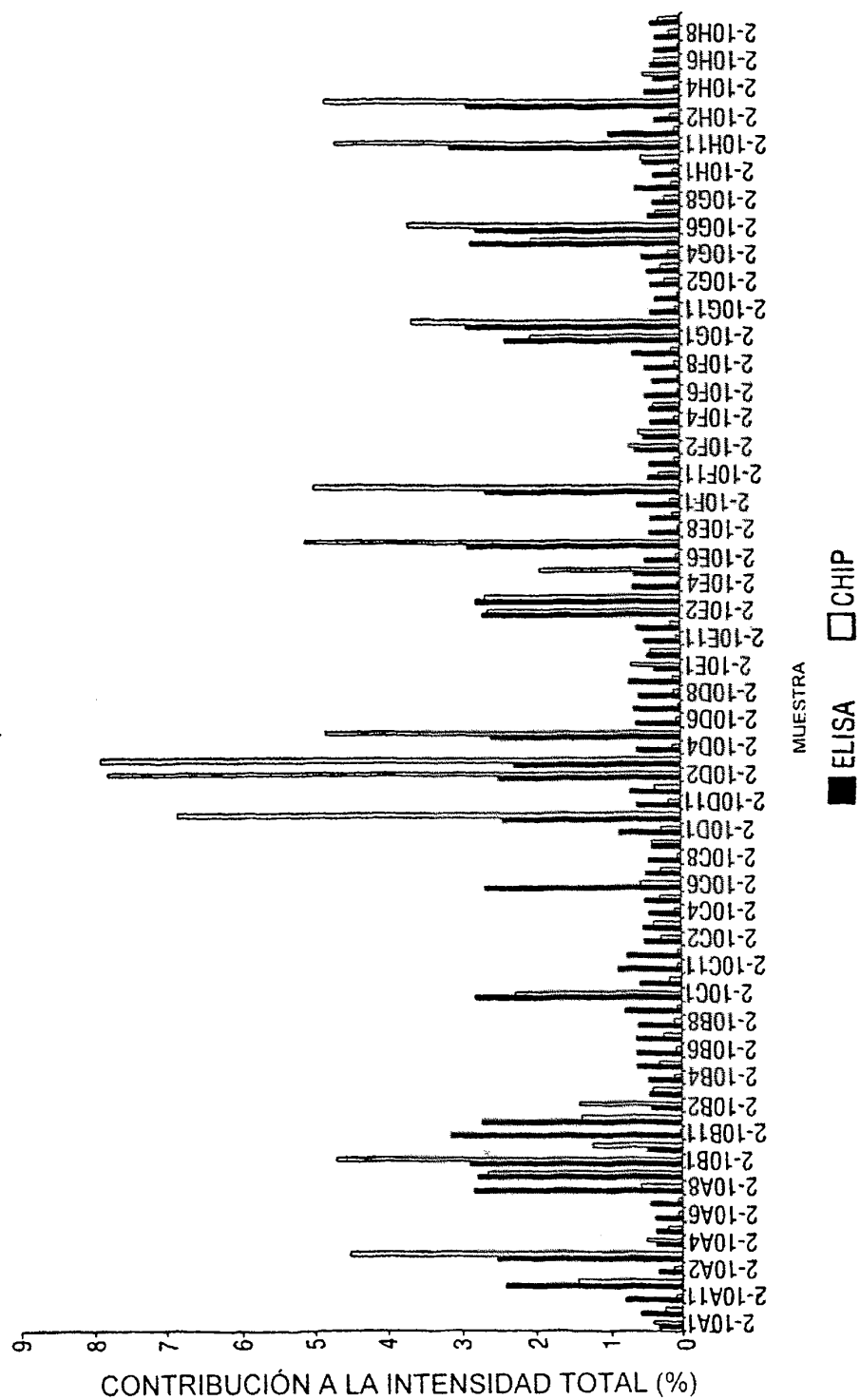
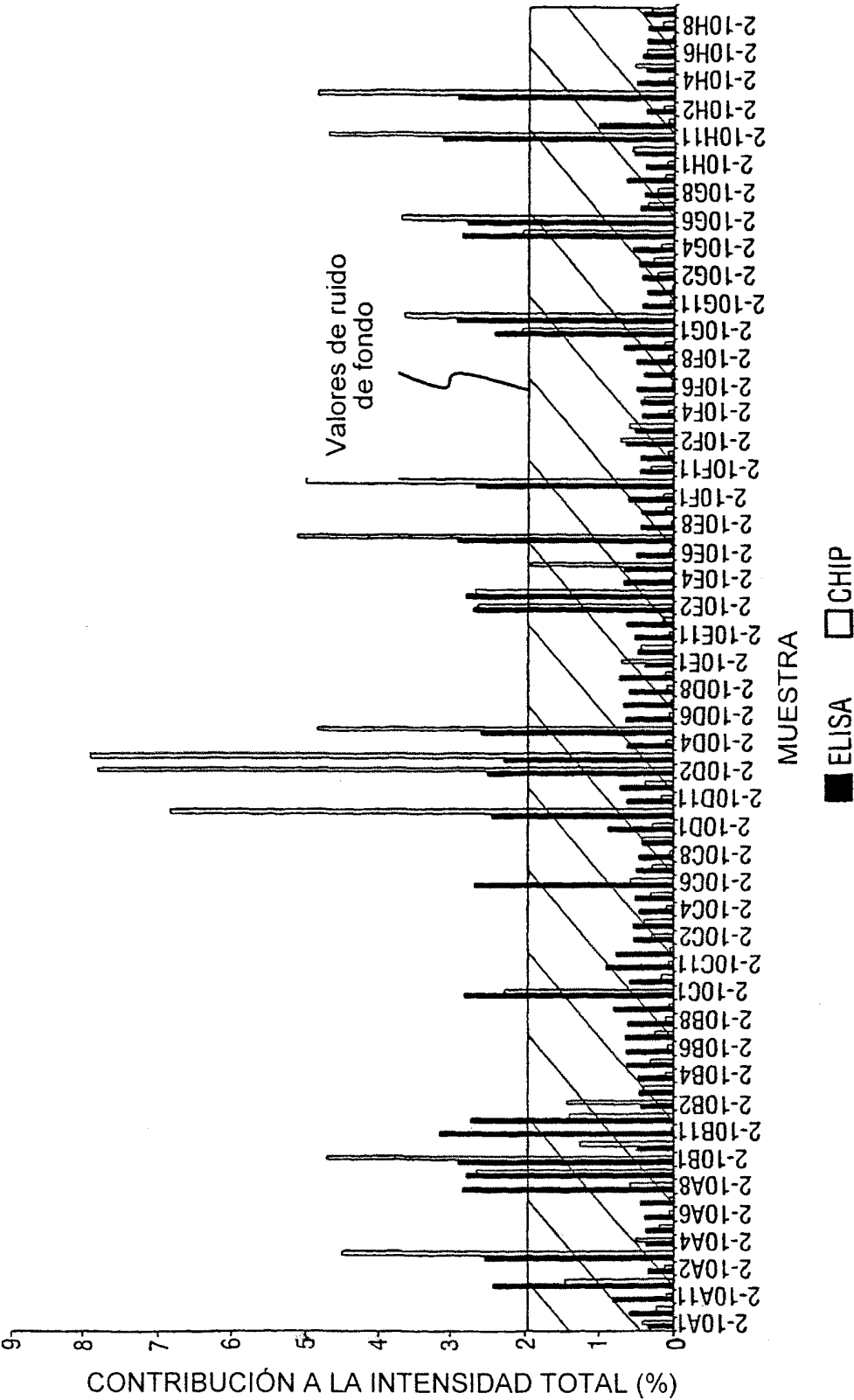


FIG. 3B
Clon B5 1B6 (Datos normalizados)



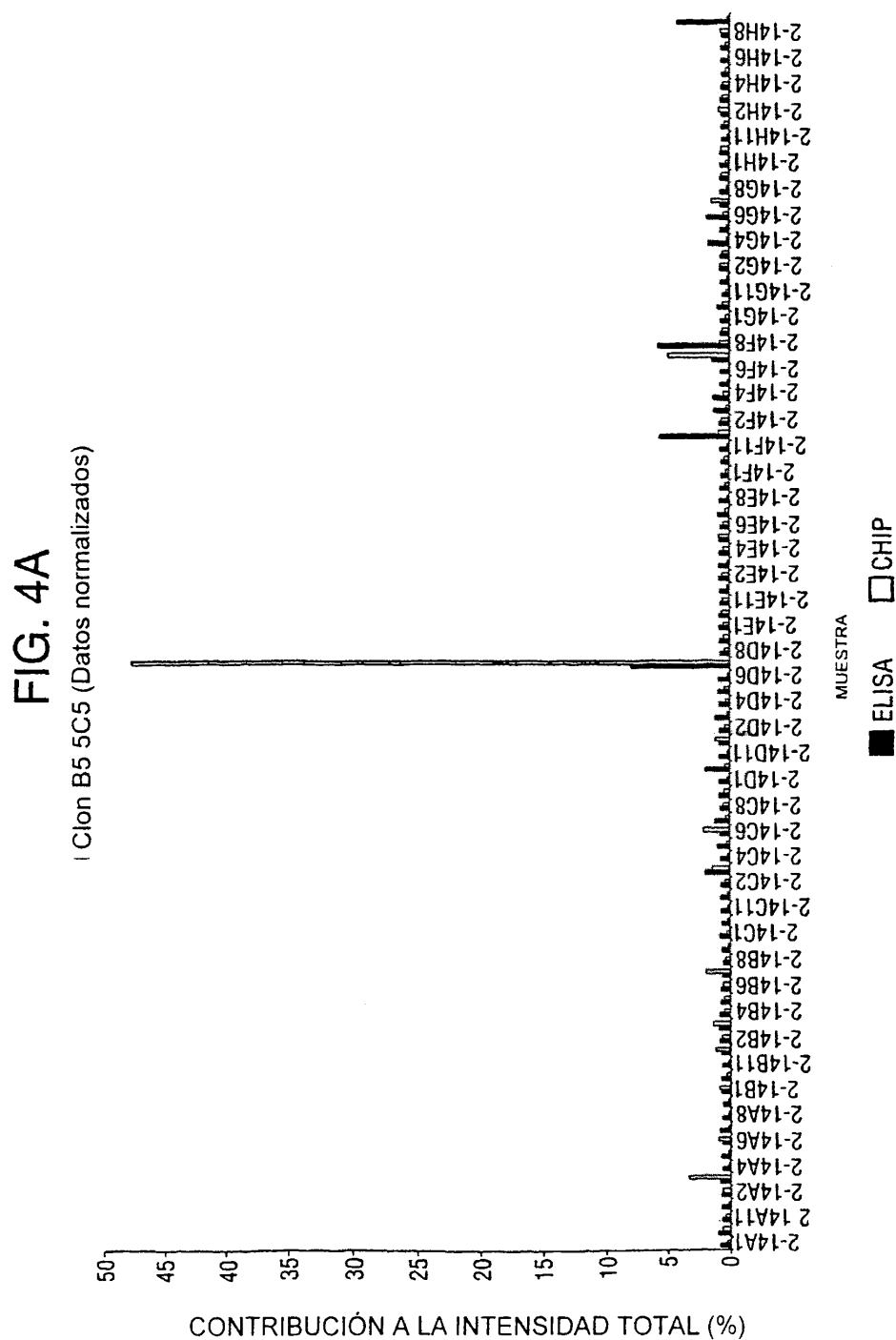


FIG. 4B

Clon B5 5C5 (Datos normalizados)

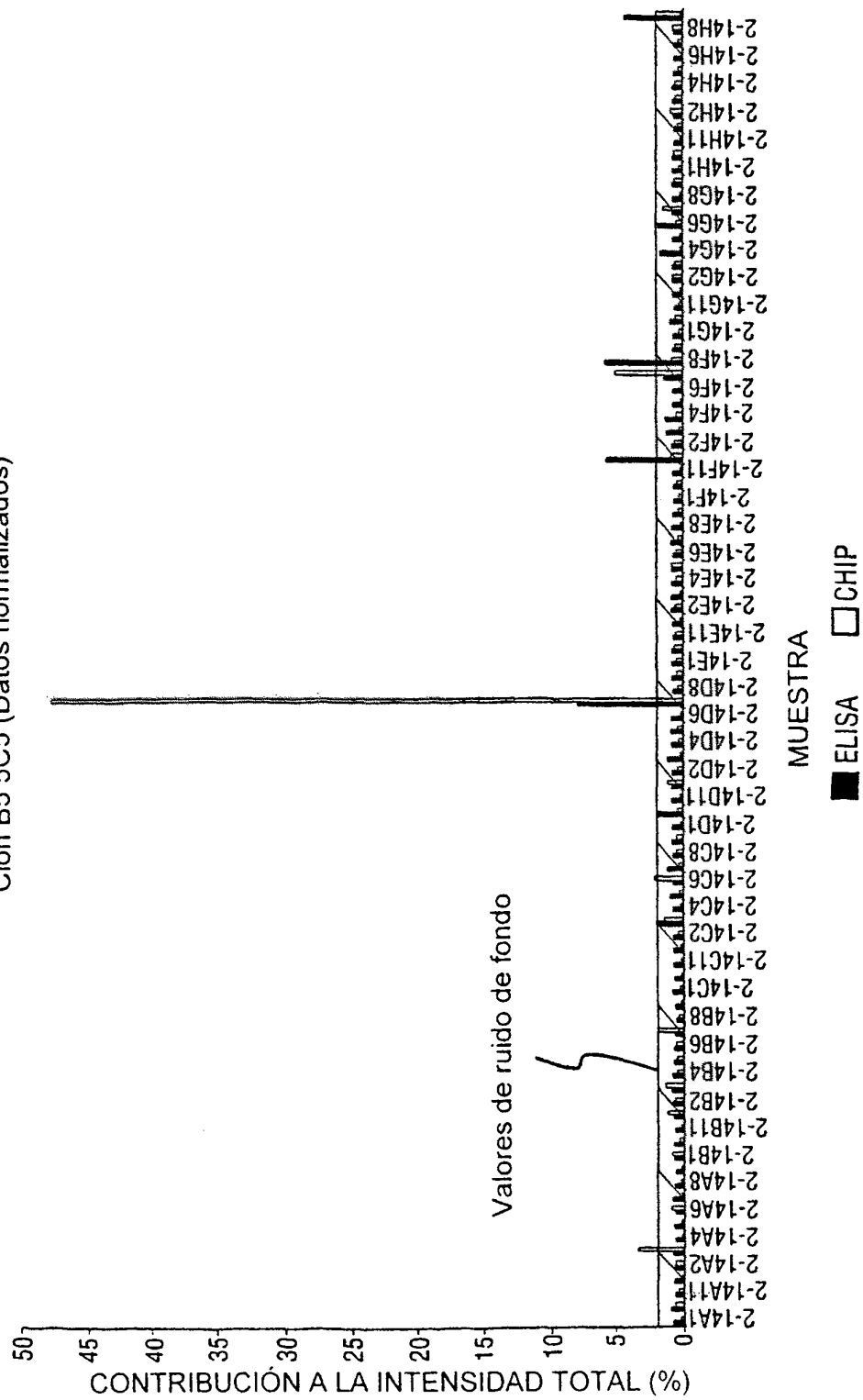


FIG. 5A

Clon Ket94/95 8D1 (Datos normalizados)

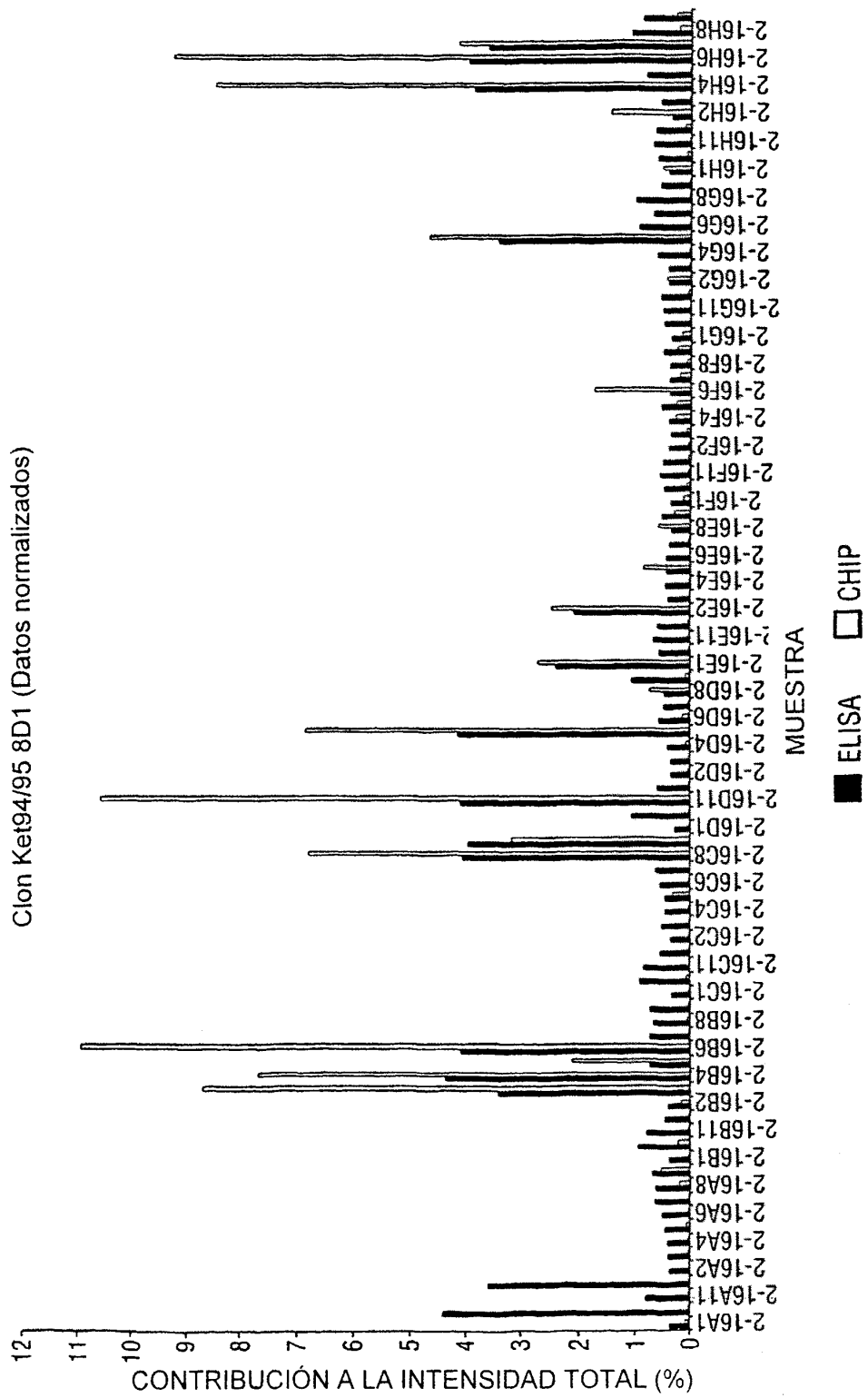


FIG. 5B

Clon Ket94/95 8D1 (Datos normalizados)

