



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 322**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06830666 .1**
96 Fecha de presentación : **15.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1974020**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Métodos para obtener células inmortalizadas que secretan anticuerpos.**

30 Prioridad: **16.12.2005 PCT/EP2005/056871**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **RIBOVAX BIOTECHNOLOGIES SA.**
12, Avenue des Morgines
1213 Petit-Lancy, Geneva, CH

72 Inventor/es: **Funaro, Ada;**
Garotta, Gianni y
Murphy, Marianne

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 367 322 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para obtener células inmortalizadas que secretan anticuerpos

5 Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con métodos para obtener células inmortalizadas que secreten anticuerpos, en particular aquellos de origen humano y que secreten anticuerpos que tengan alta especificidad por antígenos de interés médico.

10 Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos son proteínas de origen natural producidos por el sistema inmunológico con el propósito de combatir infecciones y eliminar factores patogénicos. Los anticuerpos ejercen sus funciones por medio del enlazamiento de antígenos proteicos o no proteicos y la activación de una respuesta defensiva para eliminarlos.

20 En años recientes, se ha construido un enfoque terapéutico completo (llamado inmunoterapia pasiva o seroterapia pasiva) con base en las características de enlazamiento del antígeno de anticuerpos dirigidos tanto contra moléculas humanas como no humanas. La inmunoterapia pasiva consiste en la administración de composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos terapéuticos con una especificidad definida del antígeno por una molécula patogénica (una toxina, una proteína, un virus, un parásito, o una célula, por ejemplo) a pacientes cuyo sistema inmune es incapaz de producirlos en las cantidades y/o con la especificidad requerida para bloquear y/o eliminar al patógeno (Dunman P. M. y Nesin M, 2003; Keller M. A. y Stiehm E. R., 2000).

25 Este enfoque ha sido exitosamente introducido en la práctica clínica a comienzos de los 1980, y desde entonces el uso de anticuerpos terapéuticos ha extendido rápidamente las oportunidades para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, incluidas enfermedades infecciosas, enfermedades mediadas por el sistema inmunológico y cáncer, dando como resultado un crecimiento constante del sector de anticuerpos monoclonales terapéuticos (Chatenoud L, 2005; Pavlou A y Belsey M, 2005; Laffy E y Sodoyer R, 2005).

30 Los anticuerpos adecuados para inmunoterapia pasiva son aquellos que tienen actividad y especificidad homogéneas bien definidas. Estas propiedades pueden determinarse en forma más precisa y confiable para un anticuerpo monoclonal (es decir, un anticuerpo secretado por un solo clon de células secretoras de anticuerpos) que para un anticuerpo policlonal (es decir, una mezcla compleja de anticuerpos secretada por clones diferentes de células secretoras de anticuerpos).

40 Desde los años 1970, se han desarrollado diferentes tecnologías para aislar, propagar, y mantener grandes grupos de líneas de células, cada uno derivado de un cultivo único de células monoclonales que secretan un anticuerpo monoclonal (mAb), que es analizado utilizando los ensayos apropiados, para identificar aquellos que tengan las propiedades deseadas.

Dos importantes problemas técnicos son comunes para todos estos métodos:

45 a) Cómo proveer el anticuerpo en las cantidades suficientes para los ensayos funcionales que se requieren para identificar y caracterizar el anticuerpo antes de realizar cualquier experimentación *in vivo*;
b) Cómo garantizar que el anticuerpo terapéutico no sea reconocido en sí mismo como un antígeno por parte del sistema inmunológico del paciente, activando la eliminación del anticuerpo terapéutico y/o las reacciones inflamatorias inmunológicas que puedan ser nocivas para el paciente.

50 El primer problema está relacionado con la dificultad en la propagación y el mantenimiento de células que secreten anticuerpo natural en cultivo durante el tiempo suficiente para tener el material biológico para analizar. Éste inconveniente ha sido resuelto ya sea por medio de inmortalización y manteniendo en cultivo de células que secreten anticuerpo primario en las cuales los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos han sido inicialmente generados y expresados, o por medio del uso de técnicas de ADN recombinante para el aislamiento de ácidos nucleicos que codifican al anticuerpo a partir de estas células y transferirlos dentro de células inmortalizadas, en las cuales pueden ser expresados y mantenidos.

60 En el pasado, las células que secretan anticuerpo primario han sido inmortalizadas en condiciones de cultivo de células ya sea fusionándolas con células ya inmortalizadas (formando células híbridas o hibridomas que pueden ser más fácilmente mantenidos), o por medio del uso de agentes (tales como virus) que alteran la maquinaria celular de las células que secretan anticuerpo primario de tal manera que las células se propagan casi indefinidamente.

El problema de garantizar la seguridad del paciente ha sido resuelto en el pasado ya sea haciendo uso de células y de ácidos nucleicos de origen humano para la producción de anticuerpos, o por medio de la modificación de los

genes que codifican anticuerpos no humanos, que tienen un potencial inmunogénico, con secuencia de origen humano, un proceso de "humanización" llevado a cabo utilizando tecnologías de ADN recombinante.

5 En conclusión, la inmunoterapia pasiva puede conferir una protección rápida y eficiente contra infecciones y otras patologías. Sin embargo, cada método para aislar, seleccionar, y producir anticuerpos monoclonales completamente compatibles con el tratamiento en humanos que sufran de un tipo diferente de inconveniente, como se reseña brevemente a continuación.

10 La tecnología de hibridoma, descrita por primera vez por Kohler y Milstein (Kohler G y Milstein C, 1975), permitió el aislamiento de clones en continuo crecimiento de células que secretan anticuerpo después de ser fusionadas con un tipo apropiado de célula inmortalizada. Se han derivado hibridomas a partir de células humanas que secretan anticuerpo (Olsson L y Kaplan H, 1980), pero el proceso para producir hibridomas humanos no ha demostrado ser sólido, de debido a la carencia de mieloma humano adecuado o de compañeros de fusión linfoblastoides, y a la inestabilidad de homohibridomas de humano/humano y heterohibridomas de humano/múrido.

15 En la humanización de anticuerpos de múrido puede ser lograda injertando la región de enlazamiento del antígeno del anticuerpo monoclonal de múrido sobre la columna vertebral de una molécula de anticuerpo humano, produciendo una molécula quimérica, y por medio de la sustitución de residuos específicos de múrido con otros aminoácidos humanos para reducir la antigenicidad a través de enfoques moleculares (Hwang W y Foote J, 2005; Carter P, 2006).

20 Existen numerosos anticuerpos "humanizados" actualmente en uso o en ensayos clínicos. Sin embargo, estos anticuerpos contienen aún 5 - 10% de secuencias de proteína de múrido (o no completamente humana) y pueden provocar una respuesta inmune que limita la eficacia terapéutica de estos fármacos. Además, el proceso de inmunización es laborioso y algunas veces resultan cambios para el enlazamiento del anticuerpo.

30 Por lo tanto, este método ha sido utilizado principalmente con células que secretan anticuerpo originadas en roedores inmunizados con el antígeno relevante. Teniendo en cuenta que las secuencias de origen múrido pueden ser inmunogénicas en humanos, los mAAb resultantes pueden provocar respuestas tóxicas anti-múrido de humano, que tienen una citotoxicidad celular que depende del anticuerpo afectado, y/o son rápidamente eliminadas del organismo. Además, incluso anticuerpos con idéntica región variable pueden presentar diferentes propiedades inmunogénicas y funcionales (Torres M et al., 2005).

35 Los enfoques principales para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos se basan en la clonación y la expresión de genes para la inmunoglobulina humana utilizando tecnologías de ADN recombinante.

40 En un primer caso, se pueden amplificar bibliotecas de secuencias de ADN que codifican fragmentos de anticuerpo, incluidas regiones de enlazamiento de antígeno, a partir de tejidos humanos e insertarlas dentro de un fago bacteriano, permitiendo el "despliegue" de fragmentos de enlazamiento de antígeno sobre la superficie del fago y la posterior selección. Se han producido anticuerpos monoclonales contra patógenos humanos, partiendo del gran repertorio de anticuerpos derivados de los pacientes que fue clonando y seleccionado utilizando tecnologías de despliegue en fagos (Mancini N et al., 2004).

45 Sin embargo, como se emplea bajo la mayoría de las circunstancias, estas bibliotecas pueden ser ineficaces para identificar anticuerpos terapéuticos ya que los genes para el anticuerpo no son seleccionados como el sistema inmunológico lo hace *in vivo*, por un lado, para la eliminación de las secuencias en el repertorio de anticuerpos humanos que pueden provocar una respuesta inmune, y, por otro lado, para seleccionar secuencias de anticuerpo resultantes de la maduración por afinidad. En consecuencia, la maduración compleja de la afinidad *in vitro* y otras tecnologías que permiten alteraciones directas de la secuencia son algunas veces necesarias para mejorar los anticuerpos de tales bibliotecas (Hoet R et al., 2005).

55 En un segundo caso, los ratones transgénicos que expresan genes para anticuerpos humanos pueden ser inmunizados con antígenos de interés para producir células de múrido que expresan anticuerpos completamente humanos (Kellermann S y Green L, 2002). Esta metodología tiene una ventaja sobre metodologías tradicionales de despliegue en fago debido a que los anticuerpos se seleccionan *in vivo* y pueden contener una mayor frecuencia de anticuerpos de alta afinidad. Sin embargo, el sistema inmunológico de ratón que actúa en el ambiente del ratón no puede generar anticuerpos humanos con la especificidad apropiada para uso terapéutico efectivo.

60 Por lo tanto, el anticuerpo terapéutico ideal para inmunoterapia pasiva es un anticuerpo monoclonal humano que se deriva de células inmunes humanas que han madurado en un ser humano. Sin embargo, la selección y la producción de tales anticuerpos es un proceso complejo y lento ya que los métodos convencionales para producir y aislar poblaciones de células humanas inmortalizadas viables que secreten anticuerpos en condiciones de cultivo de células son ineficientes.

Se han revisado ampliamente los procesos de desarrollo y proliferación de células B humanas, que conducen a su especificidad antigénica y a respuestas a largo plazo *in vivo*, y los medios para estudiar el proceso *in vitro* utilizando células obtenidas a partir del sistema inmunológico (Banchereau J y Rousset, F, 1992; Crotty S y Ahmed R, 2004; Carsetti R, 2004; McHeyzer-Williams L y McHeyzer-Williams M, 2005). Sin embargo, el aislamiento de células B humanas que expresan los mAb de interés se ha visto obstaculizado por la inhabilidad técnica para producir líneas de células que secreten anticuerpo humano en forma estable, incluso cuando puedan detectarse actividades relevantes de enlazamiento o neutralización.

Muchas poblaciones diferentes de células que secretan anticuerpo pueden ser aisladas a partir de donantes humanos que tengan perfiles específicos (por ejemplo individuos no tratados, vacunados, más o menos recientemente infectados y seropositivos) y de diferentes tejidos (por ejemplo sangre, amígdalas, bazo, nodos linfáticos) donde residen células B y ejercen sus actividades (Viau M y Zouali M, 2005).

La identificación de anticuerpos monoclonales humanos requiere de una selección extensa de las poblaciones de células B inmortalizadas, en donde cada célula secreta un anticuerpo monoclonal específico en cantidades suficientes para su caracterización en condiciones de cultivo de células (Cole S et al., 1984; James K y Bell G, 1987; Borrebaeck C, 1989). Sin embargo, las tecnologías para la selección, activación, e inmortalización de células que secretan anticuerpo adolecen aún de problemas técnicos (rendimiento de anticuerpo, eficiencia de la inmortalización, sobrerrepresentación de ciertos isotipos, estabilidad y crecimiento celular), lo que conduce a un número insuficiente de células y anticuerpos secretados disponibles para ensayos de secreción.

Dada dificultad para obtener hibridomas estables de células humanas que secretan anticuerpo, un método que ha sido extensamente utilizado para producir y aislar células humanas que secretan anticuerpo es la inmortalización de células B humanas con el Virus de Epstein Barr (EBV), que es también conocido por inducir la activación y proliferación de células B policlonales (Sugimoto M et al., 2004; Bishop G y Busch LK, 2002).

Las células que secretan anticuerpo han sido producidas por inmortalización del EBV utilizando diferentes fuentes de células B humanas tal como la sangre periférica de individuos sanos preseleccionados utilizando un antígeno marcado (Casali P et al. 1986), nodos linfáticos, bazo, o sangre periférica de pacientes (Yamaguchi H et al., 1987; Posner M et al., 1991; Raff H et al., 1988; Steenbakkers P et al., 1993; Steenbakkers P et al., 1994), amígdalas (Evans L et al., 1988), o fluidos pleurales (Wallis R et al., 1989).

Sin embargo, debido a una baja capacidad de transformación, baja clonabilidad, y a la inestabilidad y heterogeneidad inherentes de las células B humanas infectadas con el EBV, a menudo se pierden durante este procedimiento valiosas células B que secretan anticuerpo (Chan M et al., 1986; James K y Bell G, 1987), obligando a aplicar un procedimiento adicional de fusión de células después de la infección con el EBV (Bron D et al., 1984; Yamaguchi H et al., 1987; Posner M et al., 1991). En realidad, algunos autores concluyeron que el mejor método para producir cultivos estables de células monoclonales humanas que secretan anticuerpo IgG humano se basó en la fusión de linfocitos humanos con una línea de células de mieloma (Niedbala W y Stott D, 1998; Li J et al., 2006), a pesar de las dificultades técnicas con hibridomas humanos discutidas anteriormente.

Se han hecho varios intentos dirigidos a mejorar el proceso de inmortalización, por ejemplo combinando diferentes enfoques (inmortalización con virus oncogénico, transformación con oncogenes, mini-electrofusión, heterofusión ratón-humano) en un único proceso (US 4.997.764; Steenbakkers P et al., 1993; Dessain SK et al., 2004). Se han aislado anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B que han sido activados e inmortalizados (en presencia o en ausencia de un antígeno), y por medio de la combinación de diferentes manipulaciones en el cultivo de células (Borrebaeck C et al., 1988; Davenport C et al., 1992; Laroche-Traineau J et al., 1994; Morgenthaler N et al., 1996; Niedbala W y Kurpysz M, 1993; Mulder A et al., 1993; WO 91/09115; Hur D et al., 2005; Traggiai E et al., 2004; Tsuchiyama L et al., 1997; WO 04/076677; WO 88/01642; WO 90/02795; WO 96/40252; WO 02/46233).

En general, la literatura sobre métodos para aislar e inmortalizar células que secretan anticuerpos, especialmente de origen humano, no proporciona una comprensión clara sobre cómo diseñar el proceso completo para obtener el repertorio más grande de células inmortalizadas que secretan anticuerpo, partiendo de la purificación de las células que expresan anticuerpos de muestras biológicas hasta la selección de los anticuerpos que son secretados en las condiciones del cultivo de células.

Sería claramente ventajoso proporcionar métodos para establecer procesos más optimizados en los cuales, por medio de la aplicación de medios y condiciones específicos en el cultivo de células para mejorar la selección y viabilidad de las células que secretan anticuerpo en una forma independiente del antígeno (pero teniendo isotipos específicos de interés), se puede llevar a cabo un análisis de alto rendimiento de los anticuerpos secretados sobre la población más grande posible de células inmortalizadas que secretan anticuerpo mantenidas en condiciones de cultivo de células. Tal proceso también podría acelerar los métodos haciendo uso de enfoques moleculares para clonar genes para anticuerpos ya que la población de células B a partir de la cual los anticuerpos que tienen un isotipo de interés son clonados puede ser analizada en repetidas ocasiones para la detección de células que secretan anticuerpos con una actividad deseada y almacenada en estado de viabilidad para análisis posteriores.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en la observación de que las condiciones y medios para la selección, estimulación, e
 5 immortalización de células que secretan anticuerpo no han sido escogidos y combinados en una forma efectiva en la
 literatura para mejorar la viabilidad de las células en las condiciones de cultivo y su sensibilidad a los agentes de
 immortalización.

En realidad, sorprendentemente se encontró que combinaciones específicas de tales condiciones y medios no
 10 solamente mejoran la immortalización de las células sino que mejoran considerablemente el rendimiento y la
 reproducibilidad de todo el proceso para la generación, en una forma independiente del antígeno, de poblaciones de
 células immortalizadas que secretan anticuerpos de isotipos específicos en grandes cantidades y que pueden ser
 almacenadas en un estado viable.

Los métodos de la invención realmente proporcionan poblaciones policlonales de células que pueden ser utilizadas y
 15 mantenidas como bibliotecas de células de un isotipo específico que secretan anticuerpo. Utilizando este enfoque,
 se pueden detectar poblaciones oligoclonales o monoclonales específicas de células que secretan, en condiciones
 de cultivo de células, anticuerpos que tienen diferentes actividades funcionales y/o de enlazamiento y aislarlas en
 cualquier momento deseado (Fig. 1).

La presente invención proporciona un método para immortalizar una población de células que secretan anticuerpos
 20 de uno o más isotipos específicos que comprende las siguientes etapas:

- a) Seleccionar la población de células que secretan anticuerpos a partir de una o más muestras biológicas en una
 25 forma independiente del antígeno y sobre la base de la expresión de al menos un marcador de la superficie de la
 célula;
- b) Estimular dicha población de células seleccionadas con al menos un agente de estimulación en condiciones de
 cultivo de células;
- c) Eliminar dicho agente de estimulación del cultivo de células;
- d) Seleccionar la población de células estimuladas que expresan anticuerpos de dichos isotipos específicos de dicho
 30 cultivo de células;
- e) Exponer dicha población de células seleccionadas y estimuladas al agente de immortalización en las condiciones
 de cultivo de células;
- f) Eliminar dicho agente de immortalización de dicho cultivo de células;

En donde el agente de immortalización es un agente de immortalización del tipo viral.

Además, se pueden llevar a cabo las siguientes etapas después de la etapa (f):

- g) Mantener la población de células obtenida a partir de dicho cultivo de células en condiciones de cultivo de células;
- h) Determinar la cantidad, la viabilidad, y/o la actividad de proliferación de la población de células que secreta
 40 anticuerpos de dichos isotipos específicos en dicho cultivo de células.

Este proceso esquemático puede ser integrado y adaptado por medio de la aplicación de condiciones y medios
 45 adicionales relacionados con:

- La identificación de muestras biológicas o de donantes a partir de las cuales se pueden aislar las células;
- los medios específicos para seleccionar, estimular, y/o immortalizar células que secretan anticuerpo;
- las condiciones del cultivo de células que permiten el mantenimiento, el crecimiento, y la proliferación de la
 50 población de células immortalizadas que secretan anticuerpo en las condiciones del cultivo de células;
- los medios para determinar la cantidad, la viabilidad y/o la actividad de proliferación de la población de células que
 secreta anticuerpos de dichos isotipos específicos en dicho cultivo de células;
- las propiedades deseadas del anticuerpo y los ensayos relacionados que se escogen para seleccionar las células
 immortalizadas que secretan anticuerpo.

Los métodos de la invención proporcionan los medios y las condiciones para optimizar la selección, estimulación,
 55 immortalización, y clonación de las células que secretan anticuerpo en el ámbito de la obtención de la más grande
 diversidad y cantidad de dichas células que pueden ser mantenidas como una población de células immortalizadas
 en las condiciones de cultivo de células. En realidad, la población resultante de células puede ser considerada como
 una biblioteca de células immortalizadas que secretan anticuerpos y que pueden ser sometidas al(a los) ensayo(s)
 60 de selección deseado(s) inmediatamente después de su producción de acuerdo con los métodos de la invención, o,
 congeladas total o parcialmente, y utilizadas posteriormente en uno o más ensayos de selección.

La población de células obtenidas por medio de los métodos de la invención puede ser dividida en múltiples
 65 poblaciones oligoclonales o monoclonales de células que secretan anticuerpos en condiciones de cultivo de células,
 y en particular que secretan anticuerpos monoclonales con una actividad biológica y/o de especificidad antigénica

deseada. En realidad, el sobrenadante de estos cultivos de células se utiliza para la detección del(de los) cultivo(s) que contiene(n) los anticuerpos que tienen tal actividad biológica y/o especificidad antigénica. Tal actividad biológica y/o especificidad de enlazamiento del antígeno pueden estar dirigidas a cualquier antígeno humano, de mamífero, viral, bacteriano, de una planta, parásito, orgánico, o inorgánico de interés.

5 El aislamiento exitoso de tal población de células depende del crecimiento de las mismas, del ensayo utilizado para seleccionarlas, y de la frecuencia de las células B específicas del antígeno en el material de partida (generalmente, la sangre periférica de un donante o de un grupo de donantes). En realidad, las células inmortalizadas que secretan anticuerpo deben ser cultivadas bajo condiciones que permitan una proliferación máxima de células y de secreción de inmunoglobulina, así como el uso directo de sobrenadantes del cultivo de células para detectar la actividad deseada. Si se requiere, la población de células puede ser dividida adicionalmente para seleccionar los grupos de células que muestran la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada, hasta aislar uno o más cultivos de células, cada uno de los cuales secreta un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada en el sobrenadante celular.

15 Un anticuerpo monoclonal con una especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada puede ser por lo tanto producido por medio de la expansión del cultivo de células, y purificación del anticuerpo monoclonal a partir de los sobrenadantes de este cultivo de células. Adicionalmente, se puede aislar luego el ADN codifica al anticuerpo monoclonal y utilizarlo para la expresión recombinante del anticuerpo en las células huésped.

20 Otros objetivos de la presente invención son poblaciones de células inmovilizadas que secretan anticuerpo mantenidas en condiciones de cultivo de células (en particular cultivos de células monoclonales, oligoclonales y policlonales de células que secretan anticuerpo) obtenidas por medio de los métodos de la invención que pueden ser utilizados para identificar y producir anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser directamente purificados a partir de los cultivos celulares o producidos como proteínas recombinantes utilizando las secuencias de ADN que las codifican y aislados del cultivo de células específico. Además, se pueden preparar bibliotecas de ADN que contienen secuencias de ADN que codifican secuencias de anticuerpos de uno o más isotipos específicos, utilizando ácidos nucleicos aislados a partir de una población de células de la invención, en particular a partir de una población de células que ha mostrado que secreta anticuerpos que tienen cualquier clase de enlazamiento y/o actividad biológica de interés.

25 Otros objetivos de la presente invención están relacionados con el uso de la población de células y de los cultivos celulares obtenidos por medio de los métodos de la invención a partir de las células que secretan anticuerpo para la identificación y producción de anticuerpos monoclonales. Estos productos obtenidos por medio de los métodos de la invención pueden estar incluidos también en kits para la identificación y producción de un anticuerpo monoclonal que tenga la actividad biológica y/o especificidad para enlazamiento del antígeno deseado, o utilizados para la determinación de las características de la respuesta inmune específica del isotipo a un antígeno autólogo o heterólogo, un virus, una célula bacteriana, una toxina, una célula del parásito, o una vacuna en un individuo (o en una población de individuos).

40 Las poblaciones de células y los cultivos de células obtenidos por medio de los métodos de la invención pueden ser incluidos en los métodos para producir cultivos de células que secretan anticuerpos monoclonales en el sobrenadante del cultivo de células, y que pueden ampliarse a nivel de purificación de anticuerpos monoclonales.

45 Los ejemplos proporcionan los medios y condiciones para la aplicación de los métodos de la invención a nivel de la generación de poblaciones inmortalizadas del EBV de células B humanas para obtener, a partir de la misma muestra biológica, poblaciones de células monoclonales u oligoclonales que expresan anticuerpos IgG humanos específicos de antígeno o virus.

50 Descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática de un proceso para el aislamiento y expresión de anticuerpos monoclonales incluidos los métodos de la invención para obtener células inmortalizadas que secretan anticuerpo.

55 Figura 2: efectos sobre la proliferación de células B primarias cultivadas en presencia solamente de IL-2 (1000 U/ml) o en combinación con CpG2006, LPS, SAC o CD40L. Se purificaron células B positivas para CD22 humano por medio de separación magnética de las PBMC reunidas de cinco donantes. Se cultivaron células B durante 4 días en presencia de las concentraciones indicadas de los compuestos. Se añadió ³H-Timidina al cultivo únicamente el último día, incubando las células con nucleótido marcado durante 8 - 12 horas. En todos los experimentos estaban presentes muestras cultivadas únicamente con medio, medio con IL-2, o medio con CpG2006. Se examinaron los efectos de la combinación de IL-2 con dos agentes de estimulación LPS (A), SAC (B) y CD40L (C) como se indicó. Los valores de los recuentos por minuto (cpm) se reportan como el promedio de los pozos por triplicado. Los diferentes valores absolutos de cpm entre (A), (B), y (C) son debidos a las diferencias en la actividad específica de los lotes de ³H-timidina utilizados para cada experimento.

60 Figura 3: Efecto que depende de la dosis de CpG2006 sobre la proliferación de células de positivas para CD22 humano. Se purificaron las células B positivas para CD22 humano por medio de selección magnética de las PBMC

reunidas de cinco donantes. Se cultivaron células B con la concentración indicada de CpG2006 e IL-2 (1000 U/ml) durante 2 días. Se determinó el número de células viables (A) microscópicamente por medio de la exclusión del colorante azul de tripano. En forma paralela, se analizaron diez mil eventos de cada concesión indicada del cultivo por medio de citometría de flujo (B), midiendo tanto el porcentaje de células viables (barras negras) como de blastos

(células con mayor dispersión ortogonal y hacia adelante, barras blancas).
 Figura 4: Análisis de viabilidad con base en FACS y formación de blastos de células B positivas para CD22 o CD19 purificadas por medio de separación magnética de las PBMC reunidas de cinco donantes. Se llevó a cabo el análisis antes de (A) o después de (B) un cultivo de 4 días con una combinación de CpG2006 (1 µg/ml) e IL-2 (1000 U/ml) (B). En cada panel, se analizaron 10.000 eventos por medio de dispersión hacia adelante (eje horizontal) y dispersión ortogonal (eje vertical), como una medida del tamaño y la granularidad, respectivamente. Las células B viables están encerradas en la región R1. Las células muertas con menor dispersión hacia adelante están alineadas con el eje vertical, por fuera de R1. Las células que experimentan diferenciación de blastos tienen una dispersión ortogonal y hacia adelante más alta.

Figura 5: Cinéticas de proliferación celular y de viabilidad celular en células B estimuladas con un agente de estimulación (una combinación de CpG2006 e IL-2). Se seleccionaron las células B positivas para CD22 humano por medio de separación magnética de las PBMC reunidas de cinco donantes. Se cultivaron las células en presencia de CpG2006 (1 µg/ml) e IL-2 (1000 U/ml) durante los períodos de tiempo indicados. Se evaluó la proliferación por medio de la incorporación de ³H-timidina.

Figura 6: Efectos de la combinación de CpG2006 y de IL-2 sobre la inmortalización mediada por el EBV de células B humanas. (A) Se purificaron células B positivas para CD22 a partir de una reunión de cinco donantes por medio de selección con perlas magnéticas y se las cultivó durante 2 días en medio sólo (barras negras) o en medio que contenía CpG2006 (1 µg/ml) e IL-2 (1000 U/ml) (barras blancas). Se lavaron luego las células y se redujeron las células positivas para IgM por medio de clasificación celular. Se inmortalizaron células negativas para IgM y positivas para CD22 cultivándolas durante la noche con VN al 50% del sobrenadante que contiene al EBV en el medio de cultivo de células. Se removió el medio de cultivo de células que contenía al EBV y se cultivaron las células en medio que contenía IL-2 (1000 U/ml) y las PBMC alogénicas irradiadas como capa alimentadora durante el número de días indicado. (B) Se purificaron células B negativas para IgM y positivas para CD22 a partir de una reunión de cinco donantes por medio de selección con perlas magnéticas y se las inmortalizó cultivando las con VN al 30% del medio de cultivo con el EBV, en ausencia (barras negras) o en presencia (barras blancas) de CpG2006 (1 µg/ml) e IL-2 (10000 U/ml), utilizando las PBMC alogénicas irradiadas como capa alimentadora. Tanto en (A) como en (B), se evaluó microscópicamente el número de linfoblastos viables (células grandes) por exclusión del colorante azul de tripano.

Figura 7: Fenotipo de células B negativas para IgM y positivas para CD22 después de 2 días de estimulación previa con CpG2006 e IL-2, inmortalización del EBV, y cultivo durante 10 días (con IL-2 y una capa alimentadora alogénica irradiada de PBMC en ausencia de EBV y CpG2006). (A) Se analizaron diez mil eventos por medio del análisis de matriz de puntos para FACS donde el eje vertical representa el nivel de fluorescencia del IgM y el eje horizontal implica dispersión hacia adelante (como una medida del tamaño de las células). Los blastos viables, con altos niveles de dispersión hacia adelante, están contenidos todos dentro de los cuadrantes del lado derecho. Las células negativas para IgM están indicadas en los dos cuadrantes inferiores, con los blastos viables que no expresan anticuerpos IgM (y que expresan principalmente anticuerpos IgG) presentes en el cuadrante derecho de fondo. (B) Análisis de inmunodifusión realizado utilizando los sobrenadante es de las células B negativas para IgM, positivas para CD22 inmortalizadas del EBV, como las estimuladas y seleccionadas de acuerdo con (A). Se concentró cinco veces el medio gastado antes del ensayo. El ensayo evaluó la presencia de las inmunoglobulinas humanas secretadas totales (αhIg), IgM humana (αhIgM), e IgG humana (αhIgG) en el sobrenadante del cultivo de células utilizando anticuerpos específicos del isotipo.

Figura 8: Comparación de las poblaciones policlonales de células obtenidas de acuerdo con los métodos BÁSICO, COMBINADO, y SECUENCIAL. (A) Resumen del procedimiento para preparar las poblaciones policlonales de células de acuerdo con los métodos BÁSICO, COMBINADO, y SECUENCIAL. (B) Se comparan las poblaciones en términos del número total de células (medido por medio de citometría de flujo) y de la fracción de células viables (medida por medio de exclusión de yoduro de propidio y citometría de flujo, como se describe en materiales y métodos).

Figura 9: Se prepararon células B positivas para IgG y positivas para CD22 utilizando los protocolos BÁSICO, COMBINADO, o SECUENCIAL, como se describe en la Fig. 8 y en el Ejemplo 2. Las poblaciones resultantes de células fueron analizadas por medio de citometría de flujo (por medio de exclusión de yoduro de propidio; panel izquierdo) y, en particular para aquellas células encerradas bajo R2, para expresión de CD23 (utilizando inmunofluorescencia directa; panel derecho) al final del día 10 del cultivo. El nivel de expresión de CD23 en estas células, que son esencialmente linfoblastos viables, está indicado como el log de la fluorescencia sobre el eje horizontal (alto, medio) y el número relativo de células que expresan una cantidad dada de CD23 es mostrado sobre el eje vertical. El nivel de fluorescencia considerado como negativo (neg) fue determinado utilizando un anticuerpo de control negativo marcado correspondiente a un isotipo.

Figura 10: Análisis de la secreción de IgG en cultivos celulares que fueron preparados utilizando los métodos BÁSICO, COMBINADO o SECUENCIAL. Se recolectaron los sobrenadantes libres de células después de 10 días de cultivo (ver la Figura 8A) y se midió la concentración de IgG en diluciones seriales de sobrenadantes utilizando un kit comercial de ELISA para IgG humano total. Se midió la cantidad absoluta de IgG en cada sobrenadante por medio de la comparación con una curva estándar de IgG humano purificado proporcionado por el fabricante del kit de

ELISA, donde el rango lineal alcanzó una meseta en ~150 µg/ml. Todas las diluciones del sobrenadante del proceso secuencial resultaron en mediciones más allá del rango lineal de la curva estándar, y pueden ser extrapoladas a partir de estas mediciones únicamente si la concentración de IgG total será superior a 200 µg/ml. Por esta razón, el resultado está descrito con una línea quebrada.

5 Figura 11: Representación esquemática de un proceso general para identificar células B humanas que secretan anticuerpos IgG que enlazan y/o neutralizan citomegalovirus (CMV) humano que comprende los métodos de la invención para inmortalización de células anticuerpo-secretina; tal como células B humanas.

Figura 12: Identificación de cultivos de células B humanas que secretan IgG, inmortalizadas con el EBV que han sido obtenidas utilizando el proceso racionalizado en la figura 11 para aislamiento de anticuerpos IgG que tienen actividades diferentes. (A) Se incubaron los sobrantes de los cultivos de células B inmortalizadas con el EBV de un donante seropositivo para el CMV CON dos aislados indicados de citomegalovirus (CMV) humano y luego fueron añadidos a las células humanas indicadas. AD169 es una cepa de laboratorio de CMV humano. VR1814 es un aislado clínico de CMV humano. HELF son fibroblastos de pulmón embrionario humano y HUVEC son células endoteliales de la vena umbilical. La actividad de neutralización de los sobrenadantes seleccionados del cultivo de células que contienen al anticuerpo IgG humano se expresa en términos de menor actividad infecciosa del CMV (representativa de al menos dos ensayos). Los datos fueron obtenidos midiendo la coloración inmunohistológica para el antígeno temprano inmediato (IEA) del CMV. El control negativo era medio de cultivo de células únicamente. (B) Se reunieron los sobrenadantes de cultivos de células B humanas inmortalizadas con el EBV (5 sobrenadantes/fondo común) y se los analizó en un ELISA para detectar el enlazamiento de anticuerpos IgG humanos con proteína HSP60 humana. Los datos indican los valores promedio de los pozos por duplicado. La línea indica el valor de referencia (3 veces los niveles observados únicamente con medio de cultivo de células (RPMI-1640 y FCS al 10%). Las muestras de control positivo (un anticuerpo comercial antihumano de ratón para HSP60, en las concentraciones indicadas) y una muestra de control negativo (mIgG, un IgG no específico de ratón) reveladas con IgG anti-ratón. Todas las otras muestras de control (dos controles negativos con medio únicamente o un IgG humano no relacionado, hlgG) y las muestras que contenía en los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron revelados con un anticuerpo comercial IgG antihumano.

Figura 13: Descripción del procedimiento para preparar las poblaciones de células inmortalizadas que secretan anticuerpo de acuerdo con los métodos de la invención partiendo de la sangre de un donante humano que muestra actividad de neutralización del CMV. Las poblaciones oligoclonales y monoclonales de células inmortalizadas han sido identificadas de acuerdo con las propiedades de los anticuerpos identificados en los sobrenadantes del cultivo de células: anticuerpos secretados que enlazan con el extracto de proteína total del CMV (de acuerdo a lo analizado utilizando un kit de ELISA BEIA-CMV), que enlaza antígenos específicos (analizados utilizando fragmentos de las proteínas gB y gH del CMV), y/o neutralizan detección del CMV en un ensayo *in vitro*.

Figura 14: Identificación de cultivos de células B humanas que secretan IgG, inmortalizadas con el EBV que ha sido obtenido utilizando los procesos racionalizados en la figura 13 para el aislamiento de proteínas del CMV que enlazan anticuerpos IgG. Se prepararon células B positivas para IgG y positivas para CD22 a partir de un donante del CMV que tiene actividad neutralizante ensueño utilizando el protocolo SECUENCIAL como se describe en el Ejemplo 2. Se recolectó el sobrenadante del cultivo de células de 10 días (cultivo a granel CMV5) generado por medio del uso de la población resultante y almacenó a 4°C y analizó con el kit de ELISA BEIA-CMV descrito en materiales y métodos. Luego, se dividió el cultivo de células a razón de 20 células/pozo en placas de 96 pozos y cultivó en presencia de células alimentadoras PBMC alogénicas irradiadas, CpG2006, e IL-2 durante 4 semanas. Los sobrenadantes libres de células, que fueron preparados a partir de los pozos que contenían poblaciones de células en proliferación activa, fueron seleccionados con el kit de ELISA BEIACMV. Se incluyó el control positivo (calibrador 2, 10 AU/ml) con el kit de ELISA y se lo utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El control negativo era únicamente de medio (IMDM con L-glutamina, NEAE, FCS al 10%, CpG2006, e IL-2). Se presentan los resultados de 20 cultivos representativos de células. La línea horizontal muestra el valor doble de corte para el ensayo.

Figura 15: Secuencia de la proteína de regiones variables en la cadena pesada (A; VH; SEQ ID NO: 3) y la cadena liviana (B; VL; SEQ ID NO: 8) para el anticuerpo secretado por las células en el pozo 9G8 (ver la Fig. 14). Las secuencias de CDR para la cadena pesada (HCDR1, SEQ ID NO: 4; HDCR2, SEQ ID NO: 5; HCDR3, SEQ ID NO: 6) y la cadena liviana (LCDR1, SEQ ID NO: 9; LDCR2, SEQ ID NO: 10; LCDR3, SEQ ID NO: 11) se predicen con base en diferentes metodologías que comparan secuencias de conocidas de anticuerpo, tales como V-Quest, suministrado por IMGT (Giudicelli V. et al., 2004; que se encuentra disponible en http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/index.html) y están subrayadas. Se utilizaron diez mil células de este cultivo de células para determinar las dos secuencias utilizando protocolos estándar. Se precipitaron las células y se extrajo el ARNm con el propósito de producir el ADNc por medio de amplificación 5' RACE utilizando iniciadores degenerados VH y VL. Se clonaron luego las secuencias en plásmidos utilizados para la transformación de células bacterianas. Se determinaron las secuencias de consenso de ADN de codificación de las regiones variables en la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) y en la cadena liviana (SEQ ID NO: 7) utilizando las secuencias de al menos 4 clones independientes de células bacterianas.

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención provee métodos para mejorar la eficiencia por medio de los cuales células inmortalizadas que secretan anticuerpo pueden ser producidas y seleccionadas con base en la especificidad del antígeno y/o la actividad biológica de los anticuerpos secretados.

En particular, los Ejemplos muestran cómo la actividad de proliferación, la viabilidad y la secreción de anticuerpo de células B humanas en condiciones de cultivo de células que son immortalizadas utilizando el virus de Epstein-Barr pueden ser mejoradas por medio de la aplicación de combinaciones apropiadas de medios y condiciones sobre células primarias aisladas de donantes.

5 Se ha encontrado que la escogencia de medios y condiciones específicos relacionados con la selección y estimulación celular tiene efectos de mejoramiento inesperados e importantes para obtener células viables y en proliferación que secretan anticuerpo, contribuyendo a una mayor diversidad y cantidad de células immortalizadas que secretan anticuerpo que pueden ser posteriormente seleccionadas directamente utilizando los sobrenadantes del cultivo de células.

15 Los Ejemplos también muestran que la selección inicial de las células de las muestras biológicas puede basarse en uno o más marcadores de la superficie de la célula, seguido por una fase de estimulación en la cual se exponen las células a uno o más agentes de estimulación. Sin embargo, los agentes de estimulación ejercen su actividad máxima, sin afectar la viabilidad y proliferación de las células, únicamente si se aplican, en proporciones de concentración definida, sobre poblaciones específicamente seleccionadas de células durante un período de tiempo apropiado. Además, debe hacerse una distinción temporal y física clara entre las etapas de estimulación e immortalización, siendo evidentes los efectos negativos de exponer simultáneamente las células a los agentes de estimulación e immortalización.

20 En particular, los Ejemplos muestran cómo pueden combinarse estos elementos para establecer métodos eficientes y reproducibles para la immortalización con el EBV de células B negativas para IgM humano (o positivas para IgG) que pueden ser posteriormente clonadas y seleccionadas, utilizando sus sobrenadantes del cultivo de células y de acuerdo con las características funcionales y/o de enlazamiento de los anticuerpos que ellas producen (tales como neutralización de la infección por citomegalovirus sobre células humanas) y, finalmente, que pueden ser luego aisladas y clonadas para caracterización adicional y producción de los anticuerpos como proteínas recombinantes.

25 Los enfoques secuenciales que involucran etapas de separación de selección y activación celular antes de la immortalización han sido divulgados en la literatura únicamente en relación con poblaciones de células para el antígeno que fueron previamente inmunizadas *in vitro*, utilizando a menudo fusión con células de mieloma además de (o en vez de) un agente viral de immortalización.

30 De este modo, o bien se redujeron los tipos específicos de células de las poblaciones iniciales de células B utilizando un agente citotóxico y luego exponiéndolas al antígeno combinado con citoquinas y factores de crecimiento (Borrebaeck C et al., 1988; Davenport C et al., 1992; Laroche-Traineau J et al., 1994) o se las expuso a un procedimiento de paneo específico para el antígeno, y luego se las expandió sobre una capa de células alimentadoras antes de ser seleccionadas (Steenbakkers P et al., 1993; Steenbakkers P et al., 1994).

35 Poblaciones de células que secretan anticuerpo han sido immortalizadas ya sea utilizando immortalización estándar con el EBV, o utilizando transformación mediada por oncogén y por EBV combinados (US 4.997.764), immortalización con EBV o activación celular no específica seguida por la fusión con una línea de células de mieloma (Niedbala W y Stott D, 1998; WO 02/46233), selección de células que expresan anticuerpos que tienen un isotipo específico después de immortalización con EBV, (Morgenthaler N et al., 1996), o selección de células seguida por el uso de immortalización con EBV en presencia de un agente de activación de células B (WO 91/09115; Hur D et al., 2005; Traggiai E et al., 2004; Tsuchiyama L et al., 1997; WO 04/076677).

40 Sin embargo, ninguno de estos documentos proporciona un proceso efectivo que asocie los medios y condiciones para obtener selección y activación celular antes de la immortalización y la eficiencia de un proceso de immortalización viral que provea, en particular, poblaciones policlonales de células que puedan ser utilizadas directa y extensivamente para identificar poblaciones oligoclonales o monoclonales de células que expresan anticuerpos que tengan el isotipo y la actividad biológica deseados.

45 El principal objetivo de la presente invención consiste en un método para immortalizar una población de células que secreta anticuerpos de uno o más isotipos específicos que comprende las siguientes etapas:

- 55
- a) Seleccionar la población de células que expresan anticuerpos a partir de una o más muestras biológicas en una forma independiente del antígeno y sobre la base de la expresión de al menos un marcador de la superficie de la célula;
 - 60 b) Estimular dicha población de células seleccionadas con al menos un agente de estimulación en condiciones de cultivo de células;
 - c) Eliminar dicho agente de estimulación del cultivo de células;
 - d) Seleccionar la población de células estimulada que expresa anticuerpos de uno o más isotipos a partir de dicho cultivo de células;
 - 65 e) Exponer dicha población de células seleccionadas y estimuladas al agente de immortalización en las condiciones del cultivo de células;

f) Eliminar dicho agente de inmortalización de dicho cultivo de células;

En donde el agente de inmortalización es un agente de inmortalización viral.

5 Este método puede estar integrado con una serie de etapas adicionales que están relacionadas con el análisis y el uso de la población de células que se obtiene por medio de la aplicación de este método (Fig. 1). En particular, se deben llevar a cabo las siguientes dos etapas, después de la etapa (f) ya que ellas son importantes para el establecimiento de cultivos celulares que contengan esta población de células:

10 g) Mantener la población de células obtenida a partir de dicho cultivo de células en las condiciones del cultivo de células i;

h) Determinar el número, la viabilidad, y/o la actividad de proliferación de la población de células que secretan anticuerpos de dichos isotipos específicos en dicho cultivo de células.

15 El texto y las figuras proporcionan detalles adicionales sobre cómo se pueden aplicar los métodos de la invención, en particular sobre células B humanas aisladas de muestras de sangre periférica, para proveer cultivos de células monoclonales que secreten anticuerpos de interés.

20 En realidad, los métodos de la invención permiten obtener, por un lado, poblaciones de células que representan eficientemente, en una forma independiente del antígeno, la heterogeneidad del repertorio de anticuerpos de los isotipos deseados expresada en las células primarias tomadas de los individuos y capturadas a través de la inmortalización viral.

25 Por otro lado, entre más uniformemente proliferen en gran medida y en forma viable las poblaciones de células que secretan anticuerpo que se obtienen por medio de los métodos de la invención, esto permite un análisis más profundo de tal repertorio de anticuerpos por medio de diferentes productos biológicos que pueden ser obtenidos ya sea en las condiciones de cultivo de células (por ejemplo población de células, sobrenadantes del cultivo de células que contienen grandes cantidades de anticuerpos) o como otras entidades moleculares (por ejemplo bibliotecas de ADN preparadas utilizando ácidos nucleicos extraídos de poblaciones oligoclonales de células).

30 Además, los métodos de la invención proveen la posibilidad de obtener suficientes anticuerpos y células inmortalizadas que secretan anticuerpos para ser caracterizados directamente en los cultivos celulares generados por división de la población policlonal de células inmortalizadas que secretan anticuerpo (recientemente preparadas o debidamente preparadas, congeladas, y descontroladas) en reservorios que contienen estadísticamente 20 o menos células y cultivadas en condiciones estandarizadas. Entre menor es el número de etapas en la clonación (virtualmente una sola, en vez de las dos o más etapas usuales) se acorta el tiempo para identificar las células inmortalizadas que secretan anticuerpos de interés, limitando el riesgo de perderlas en etapas de subclonación y acelerando la caracterización de los anticuerpos en diferentes ensayos *in vivo* o *in vitro*. Esto es de particular importancia para el aislamiento de anticuerpos poco comunes específicos para poder lograr más rápida y exitosamente objetivos terapéuticos.

40 Por lo tanto, se pueden adaptar e integrar los métodos de la invención en métodos más complejos para identificar y producir anticuerpos monoclonales de isotipos específicos que están resumidos en el texto (ver en particular en el Ejemplo 3), y en las figuras (ver en particular las Figs. 1, 11, y 13).

45 Las definiciones y detalles adicionales sobre los medios y las condiciones aplicables a los métodos de la invención son suministrados en los siguientes párrafos, junto con la descripción de los usos posibles de dichos métodos y de los productos que pueden ser obtenidos utilizando dichos métodos (poblaciones de células, cultivos de células, sobrenadantes del cultivo de células, y anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales humanos).

50 El término "población" de células se refiere en general a cualquier grupo de células (células que secretan anticuerpo, en el presente caso) que son aisladas utilizando el mismo criterio o generadas utilizando los mismos métodos. Por ejemplo, poblaciones de células son aquellas resultantes de una etapa de selección (por ejemplo clasificación de células), un tratamiento (por ejemplo con agentes de estimulación o de inmortalización viral), o la división de un cultivo o una población de células en grupos más pequeños de células que tienen estadísticamente la misma cantidad de células (por ejemplo cuando se subclona un cultivo de células o se preparan viales de células inmortalizadas que son congeladas para mantenerla durante un largo período de tiempo). Una población de células deben ser viable pero no necesariamente ejercer una actividad biológica específica (por ejemplo crecimiento, proliferación, o secreción de anticuerpos), como ocurre en condiciones de cultivo de células.

60 El término "cultivo" de células se refiere a una población de células que es mantenida en un contenedor (por ejemplo el pozo de una placa, una caja de Petri, un frasco, una botella) con el propósito de elaborar células que realicen actividades biológicas (por ejemplo crecimiento, proliferación, o secreción de anticuerpos), y/o de tratarlos con compuestos específicos (por ejemplo agentes de estimulación o inmortalización viral). Estas condiciones experimentales (es decir, las condiciones del cultivo de células) incluyen el uso de incubadoras mantenidas a una

65

temperatura y en una atmósfera (junto con el uso de un medio de cultivo de células) apropiadamente escogidos para el crecimiento y la proliferación de las células.

5 Por lo tanto, un cultivo de células está compuesto de la población de células junto con el medio de cultivo de células (que incluye sueros, factores de crecimiento, citoquina, nutrientes, etc.) y, como en el caso de las células que secretan anticuerpo, de células adicionales que son cultivadas también para ayudar al crecimiento y la proliferación de la población de células (las así llamadas "células alimentadoras"). Después de unos pocos días o semanas, la composición del medio de cultivo de células se altera no solamente por el consumo de las células sino también por la gran variedad de moléculas que secretan las células, o que simplemente liberan cuando entran en apoptosis o mueren. De este modo, el medio de cultivo de células es regularmente sustituido por uno nuevo, o puede ser parcialmente removido para analizar el contenido del medio de cultivo de células. El medio de cultivo de células utilizado (definido en la literatura como "sobrenadante" del cultivo de células, así como medio de cultivo de células "consumido" o "acondicionado") puede ser recogido después de un período de tiempo preestablecido para determinar, por ejemplo, el contenido y la actividad de los anticuerpos que han sido secretados por la población de células en las condiciones del cultivo de células. Esta información, junto con los datos sobre la viabilidad y la proliferación de tales células, deben ser utilizados para definir el estado y el uso posible del cultivo de células (por ejemplo para el aislamiento de ARNm, en ensayos de selección, para purificar anticuerpos monoclonales, para recolectar células que van a ser congeladas, etc.)

20 El término "policlonal" se refiere a un cultivo o a una población de células que expresa una gran cantidad de anticuerpos diferentes (por ejemplo 10^3 , 10^4 , 10^5 o más) cada uno de los cuales es expresado por células individuales o por un grupo de células dentro del cultivo o de la población. En particular se aplica a un cultivo o a una población de células obtenidos por medio de los métodos de la invención (ya sea generados en una forma independiente del antígeno a partir de las células presentes en una muestra biológica) que no está dividida en cultivos o poblaciones, o, a lo sumo, dividida en cultivos o poblaciones inicialmente de 50 o más células (por ejemplo 200, 500, 1000 o más células) como puede determinarse estadísticamente con base en la dilución del cultivo o la población policlonal original.

30 El término "oligoclonal" se refiere a un cultivo o a una población de células resultante de la división de un cultivo o de una población de células en cultivos o poblaciones que contienen inicialmente menos de 50 células (40, 20, 10, 5, 1, o menos de 1 célula), como puede determinarse estadísticamente con base en la dilución del cultivo o población original.

35 Los cultivos o poblaciones oligoclonales que resultan de la división de un cultivo o población de células en cultivos o poblaciones que inicialmente contienen 20 células o menos son de importancia particular. En realidad, si se detecta una característica biológica única, como un predominante en el cultivo de células resultante (por ejemplo un anticuerpo identificado como una proteína secretada en el sobrenadante del cultivo de células utilizando un ensayo biológico o como un gen transcrito en el ARNm aislado del cultivo utilizando RT-PCR), tal cultivo de células puede ser considerado como un cultivo de células monoclonal.

40 Un "cultivo de células monoclonales" es un cultivo de células que contiene únicamente (o la gran mayoría de) células idénticas entre sí, que son originadas por la proliferación (y opcionalmente la diferenciación) de una sola célula (clon), al menos como puede evaluarse con base en una característica biológica específica (por ejemplo secreción de un anticuerpo específico) que ha sido utilizado para seleccionar el cultivo de células. Por lo tanto, un anticuerpo, una población de células, o un cultivo de células derivado de tal cultivo puede decirse que es "monoclonal" aunque puede requerirse de actividades experimentales adicionales para establecer la clonabilidad en una forma más precisa.

50 El término "inmortalizado" se refiere en forma general a los cultivos y a las poblaciones de células obtenidos a partir de los métodos de la invención, después de exponer a la población seleccionada y estimulada de células al agente de inmortalización viral. Aunque la inmortalización viral puede estar asociada con la presencia de productos virales específicos (por ejemplo proteínas, transcriptos), las células se definen como inmortalizadas cuando ellas muestran un crecimiento y proliferación continuos en las condiciones del cultivo de células. Como se observa en los Ejemplos, la primacía de células B humanas que se obtienen a partir de una muestra biológica y que expresan anticuerpos, fueron exitosamente utilizadas para obtener poblaciones policlonales de células que fueron utilizadas entonces para generar cultivos de células oligoclonales que contienen al menos 10^4 células. Cuando se inicia el cultivo a partir de 100, 50, 20 o incluso de 5 células, tal número total de células es compatible únicamente con un número de divisiones de células (10 o más divisiones de células) que en general únicamente las células inmortalizadas pueden llevar a cabo en condiciones de cultivo de células.

60 El término "células que secretan anticuerpo" se refiere a las células primarias que contienen los genes para expresión de anticuerpos y que tienen la capacidad para secretarlos en el espacio extracelular (por ejemplo en la sangre *in vivo* o en el sobrenadante del cultivo de células *in vitro*).

- 5 El término "células inmortalizadas que secretan anticuerpo" se refiere a células que secretan anticuerpo que, después de la exposición a un agente de inmortalización viral, crecen, proliferan, y secretan anticuerpos en condiciones de cultivo de células en forma indefinida, o al menos durante un período el tiempo y/o durante una cantidad de divisiones celulares muy superior a aquella observada si las células primarias no son expuestas al agente de inmortalización viral. En particular, las poblaciones policlonales de células obtenidas por medio de los métodos de la invención están enriquecidas en linfoblastos que crecen en forma viable que son las células inmortalizadas que secretan anticuerpo las cuales formarán entonces las poblaciones oligoclonales y monoclonales de células en las condiciones del cultivo de células.
- 10 El término "agentes estimulador" se refiere a un compuesto, o a una combinación específica de compuestos, capaz de producir una respuesta de estimulación mediada por células que secretan anticuerpo, induciendo una proliferación y un estado blástico de estas células y la formación de linfoblastos (células grandes viables, de acuerdo a lo medido por microscopia y por medio de dispersión hacia adelante/ortogonal para FACS) en condiciones de cultivo de células.
- 15 El término "fase de estimulación" se refiere al periodo de tiempo durante el cual las células seleccionadas que secretan anticuerpo son expuestas al agente estimulador.
- 20 El término "agente de inmortalización viral" se refiere a cualquier clase de partícula viral, ADN, o proteína, que permite la generación de células inmortalizadas a partir de células primarias aisladas de muestras biológicas. En el presente caso, las células primarias son células que secretan anticuerpo, en particular células B humanas, para las cuales se han identificado diferentes agentes de inmortalización viral.
- 25 El término "fase de inmortalización" se refiere al periodo de tiempo durante el cual se exponen las células seleccionadas y estimuladas que secretan anticuerpo al agente de inmortalización viral.
- Una etapa preliminar para llevar a cabo los métodos de la invención es la identificación de individuos o de tejidos a partir de los cuales se deben aislar las muestras biológicas que contienen células que secretan anticuerpo.
- 30 Como se indicó en Los antecedentes de la invención, se han aislado e inmortalizado las células que expresan y secretan anticuerpos a partir de diferentes tejidos y órganos, incluyendo sangre, amígdalas, bazo, fluidos biológicos (tales como fluido cerebroespinal o pleural), nodos linfáticos, y otros órganos linfáticos.
- 35 Las células que pueden ser inmortalizadas utilizando los métodos de la invención deben ser extraídas a partir de esos tejidos y órganos de mamífero. Obviamente, se prefieren las células de origen humano para producir cultivos celulares que secreten anticuerpos monoclonales humanos que tengan uso terapéutico o diagnóstico. Sin embargo, se pueden aplicar los métodos sobre células no humanas que secreten anticuerpos (células de roedores o de simios, por ejemplo).
- 40 Se pueden aislar muchos tipos diferentes de poblaciones de células primarias que secreten anticuerpo a partir de donantes humanos que tengan perfiles que puedan ser preferibles de acuerdo con el estado del donante de células inmunológicas, así como el isotipo y la actividad del anticuerpo buscado.
- 45 Los métodos de la invención pueden ser aplicados para la identificación de anticuerpos monoclonales expresados por células B humanas seleccionadas de donantes, tales como pacientes expuestos a un agente infeccioso o que tengan formas específicas de cáncer o de una enfermedad autoinmune. Por lo tanto, el donante puede ser un individuo no tratado, vacunado, afectado por una o más enfermedades o infecciones, ya expuesto y/o resistente a tratamientos terapéuticos específicos, que presenten un índice o estatus clínico específico, expuesto accidentalmente a un patógeno, etc.
- 50 Se pueden utilizar sueros de donantes como tales para una determinación inicial de su seropositividad a un antígeno, ya que la especificidad y el mantenimiento a largo plazo de la respuesta inmune adaptativa (incluso años después de la última exposición a este antígeno) puede permitir una determinación cualitativa que será suficiente para seleccionar donantes. La naturaleza y la severidad del ensayo de selección utilizado es crítico en la
- 55 identificación de los donantes más adecuados y, preferiblemente, el ensayo utilizado para seleccionar el suero del donante debe ser el mismo que aquel utilizado para seleccionar sobrenadantes a partir de células B inmortalizadas que secretan anticuerpo y diseñado para detectar un anticuerpo con la actividad funcional deseada (es decir prevención de la entrada del virus dentro de las células, o el enlazamiento con un antígeno asociado con un tumor).
- 60 En el contexto clínico, la escogencia del tejido o el del órgano a partir del cual se purifican las células puede ser dictada a partir de la disponibilidad de las células en cantidad suficiente para llevar a cabo el proceso completo. Dado que se pueden obtener las células partir de muestras clínicas humanas en cantidades pequeñas y/o que pueden ser preparadas en sitios diferentes de donde se pueden llevar a cabo los métodos de inmortalización, se pueden obtener las células a partir de muestras congeladas y/o a partir de muestras obtenidas de una cantidad de
- 65 individuos que han sido reunidas para proporcionar suficiente material de partida.

Por lo tanto, puede hacerse una selección preliminar sobre un panel de donantes candidatos, utilizando muestras que contienen células que secretan anticuerpo (tales como sangre periférica total o suero). En particular, se pueden aislar células mononucleares de sangre o de tejidos linfáticos utilizando técnicas estándar de separación para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tales como centrifugación por gradiente. Antes y/o después de esta etapa de separación, se pueden preseleccionar las muestras de sueros (o de plasma), los sobrenadantes de cultivo de células, o células (obtenidas de diferentes pacientes, de diferentes tejidos, y/o en diferentes momentos) utilizando tecnologías estándar para detectar la presencia de anticuerpos y de células que secretan anticuerpo (por ejemplo ELISA, BIACORE, transferencias tipo Western, FACS, SERPA, arreglos de antígeno, neutralización de una infección viral en un sistema de cultivo de células, o ensayos ELISPOT).

La literatura proporciona diferentes Ejemplos de estas tecnologías mostrando, por ejemplo, el uso de ELISPOT para caracterizar la respuesta inmune en donantes vacunados (Crotty S et al., 2004), el uso de microarreglos de antígeno como herramientas de diagnóstico para pacientes recientemente infectados (Mezzasoma L et al., 2002), y otras tecnologías para la medición de respuestas inmunes específicas de antígeno (Kern F et al., 2005). La escogencia de los donantes puede basarse también en la asociación de la seropositividad para virus específicos con alteraciones relacionadas con oncogénesis (Butel J, 2000).

Este análisis cualitativo preliminar de respuesta de anticuerpos al objetivo terapéutico (evaluado a nivel de actividad total o de actividad específica del isotipo) debe permitir la identificación de los donantes que tengan células B que expresen los títulos más altos de anticuerpo dirigidos al antígeno purificado deseado (por ejemplo una proteína recombinante humana específica relacionada con un cáncer o una proteína viral específica), una mezcla de antígenos relacionados (por ejemplo obtenida a partir de una preparación viral parcialmente purificada), o un bioensayo (por ejemplo neutralización de la ineffectividad viral).

Una vez se han seleccionado uno o más donantes, la fuente de células B puede ser de bazo, sangre, nodos linfáticos, médula ósea, linfocitos que infiltran al tumor, linfocitos de los sitios de inflamación/infección crónica. Sin embargo, usualmente es más fácil obtener sangre periférica de los donantes, de almacenar, y de monitorear la respuesta serológica contra un antígeno durante un período definido de tiempo.

Por ejemplo, partiendo de 5 - 50 ml de sangre periférica, se pueden purificar aproximadamente 10 - 100 millones de PBMC (células mononucleares de sangre periférica), una cantidad de células que debe permitir obtener una población suficientemente grande de células que secretan anticuerpo que son seleccionadas después de ser inmortalizadas utilizando los métodos de la invención.

Después del aislamiento de las PBMC de las muestras biológicas, se puede llevar a cabo una selección específica de células que secretan anticuerpo, utilizando uno de los muchos métodos descritos en la literatura, con base en la expresión de los marcadores la superficie de la célula sobre su superficie y, si procede, de otras proteínas, así como la actividad de proliferación, el estatus metabólico y/o morfológico de las células.

En particular, diferentes tecnologías para la purificación de células que secretan anticuerpo a partir de muestras humanas hacen uso de diferentes medios y condiciones para selección positiva o negativa. Estas células son más fáciles y eficientemente seleccionadas separando físicamente aquellos marcadores que se expresan en la superficie de la célula, específicos para células que expresan y secretan anticuerpos (por ejemplo células B humanas). Se pueden encontrar protocolos específicos en la literatura (ver Callard R y Kotowicz K "Human B-cell responses to cytokines" en *Cytokine Cell Biology: A practical Approach*. Balkwill F. (ed.) Oxford University Press, 2000, páginas 17 - 31).

La selección usualmente se hace utilizando anticuerpos que se enlazan específicamente con una de estas proteínas de la superficie de la célula y que pueden estar enlazados a soportes sólidos (por ejemplo microesferas o placas de plástico) o marcados con un fluorocromo que puede ser detectado utilizando clasificadores de células activados por fluorescencia (FACS). Por ejemplo, se han seleccionado células B humanas con base en su afinidad por soportes (tales como microesferas), que se enlazan con microesferas CD 19, CD27, y/o CD22, o por la falta de afinidad de enlazamiento por anticuerpos específicos para ciertos isotipos antes de inmortalización con EBV (Li H et al., 1995, Bernasconi N et al., 2003; Traggiai E et al., 2004).

Sin embargo, la escogencia del marcador celular puede ser relevante para la eficiencia del proceso de inmortalización, probablemente debido a señales intracelulares que son activadas por el proceso de selección y que pueden alterar el crecimiento y la viabilidad de las células. En realidad, los Ejemplos de la presente solicitud de patente muestran que CD22, que es una proteína transmembrana restringida a células B que controla las rutas de transducción de la señal relacionadas con el reconocimiento del antígeno y la activación de células B (Nitschke L, 2005), aparecen como una molécula preferida para la selección inicial de células B. Ya que la población positiva para CD22 contiene células que expresan anticuerpos que tienen diferentes isotipos y especificidades, se pueden utilizar otros marcadores de la superficie de la célula para seleccionar las células, ya sea antes o después de la fase de estimulación.

- Alternativa o adicionalmente, se puede obtener un enriquecimiento específico de células que secretan anticuerpo por medio de la aplicación de una selección con base en CD27 además de la selección con base en CD22. Se sabe que CD27 es un marcador para células B que tiene genes de la región variable somáticamente mutados (Borst J et al., 2005). Se pueden utilizar marcadores adicionales tales como CD5, CD24, CD25, CD86, CD38, CD45, CD70, o CD69 ya sea para agotar o para enriquecer la población deseada de células. Por lo tanto, dependiendo de la historia del donante de exposición al antígeno (por ejemplo viral, bacteriana, parasitaria), del título del anticuerpo, se puede tomar una decisión en cuanto a si utilizar todas las células B enriquecidas con CD22, o subpoblaciones de células B enriquecidas adicionalmente tales como células B positivas para CD27.
- Después de la selección de las células, pero antes de la fase de inmortalización, se debe exponer la población de células a un agente estimulador apropiado. En el contexto de la presente invención, están previstas tres categorías principales de compuestos como agentes estimuladores aplicables que pueden ser utilizados, especialmente en combinación.
- Un primer grupo de agentes estimuladores está representado por un activador de la respuesta inmunitaria innata, tal como un agonista de un Receptor Tipo Toll que se expresa sobre células B. Se sabe que los Receptores Tipo Toll (TLR) juegan un papel importante en el reconocimiento de oligonucleótidos bacterianos y de otros compuestos que provocan la activación policlonal de una gran variedad de células involucradas tanto en inmunidad innata como adquirida (Akira S y Takeda K, 2004; Peng S, 2005). Esta ruta de respuestas inmunológicas mediadas en parte por los Receptores Toll es una de las primeras respuestas del organismo a los organismos invasores y juega un papel importante en la creación del ambiente apropiado y de citoquinas requerido para provocar la respuesta potente y específica mediada por las células B y T de la respuesta inmunológica adaptativa (Gay et al., 2006). Esta capacidad de respuesta de líneas de células humanas y de células primarias es debida a algunos receptores del tipo Toll (TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10), teniendo cada uno perfiles de expresión específicos, ligandos preferidos y requerimientos de reconocimiento.
- En particular TLR9 humano reconoce oligonucleótidos, más específicamente oligonucleótidos con base en CpG (Hemmi H et al., 2000). La activación mediada por TLR9 por medio de compuestos con base en CpG tal como aquel conocido como CpG2006 activa alteraciones en el balance redox celular y la inducción de rutas de señalización celular incluidas las proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y NF kappa B, seguido por la producción de citoquinas proinflamatorias, interferones, y quemoquinas. (Takeshita F et al., 2001; Hartmann G et al., 2000; Hartmann G y Krieg A, 2000; Ulevitch R, 2004). Subconjuntos de células B de memoria y *naïve* humanas tienen propiedades de proliferación y diferenciación específicas en respuesta a estímulos policlonales, tales como oligonucleótidos CpG, como consecuencia de la estricta regulación de la expresión de los TLR (Bernasconi N et al., 2003; Bernasconi N et al., 2002; Bourke E et al., 2003). Los oligonucleótidos CpG inducen activación de inmunidad innata y pueden proteger contra el reto letal con una amplia variedad de patógenos (Krieg A, 2002). Por ejemplo, aquellos oligonucleótidos que contienen al motivo llamado CpG-B son activadores especialmente potentes de células B primarias (Krieg A et al., 1995; Gursel M et al., 2002; Klinman D, 2004; Eaton-Bassiri A et al., 2004).
- Se han identificado varias categorías de compuestos que son activos como agonistas para un receptor tipo Toll (Coban C et al., 2005; Kandimalla ER et al., 2005; Hayashi E et al., 2005; Bourke E et al., 2003; Ambach A et al., 2004; Sen G et al., 2004) y se encuentran disponibles tecnologías de selección específicas, también para determinar la producción diferencial de clases y subclases de inmunoglobulinas (Henault M et al., 2005; Cognasse F. et al., 2005).
- Un segundo grupo de agentes de estimulación está representada por citoquinas, en particular interleuquinas conocidas por tener tales actividades de inmunoestimulación (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) y que han sido comparadas en la literatura (ver Callard R y Kotowicz K "Human B-cell responses to cytokines" en *Cytokine Cell Biology: A practical Approach*. Balkwill F (ed.) Oxford University Press, 2000, páginas 17 - 31).
- Un tercer grupo de agentes de estimulación está representado por agonistas de receptores de la membrana celular de la familia del receptor TNF, en particular aquellos que activan la ruta NF-kB y la proliferación en células B, tales como APRIL, BAFF, o CD40L (Schneider P, 2005; He B et al., 2004; Craxton A et al., 2003; Tangye S et al., 2003).
- Es importante indicar que la escogencia y la concentración del agente estimulador, su combinación, así como la longitud de la fase de estimulación, tiene que ser escogido para obtener un efecto óptimo tanto sobre la estimulación celular como la expresión de proteínas lo que permite, o refuerza, la inmortalización de las células que secretan anticuerpo.
- Los Ejemplos muestran que los agentes estimuladores útiles, en particular cuando el agente de inmortalización viral es el virus de Epstein-Barr, pueden ser escogidos entre la siguiente combinación de compuestos:
- Una combinación de un oligonucleótido basado en CpG y una citoquina;
 - Una combinación de un agonista de un receptor de la membrana celular de la familia del receptor del TNF y una citoquina.

Con base en sus propiedades estimuladoras, CpG2006 ha sido utilizado simultáneamente con EBV para la producción de células B humanas inmortalizadas (Traggiai et al., 2004; WO 04/76677), como se ha hecho con el Ligando soluble CD40 o anticuerpos agonísticos contra CD40 (WO 91/09115; WO 94/24164; Tsuchiyama L et al., 1997; Imadome K et al., 2003).

Sin embargo, un enfoque similar afecta negativamente el mantenimiento y la selección de las células B inmortalizadas ya que se sabe que activadores policlonales tales como CpG2006 tienen efectos potentes sobre una variedad de tipos de células que pueden estar presentes durante la clonación y/o los siguientes procesos de selección en el cultivo de células (Hartmann G y Krieg A, 2000; Hartmann G et al., 2000). En particular, las CpG son potentes inductores de citoquinas tales como IL-12 e IFN-gamma por medio de células mononucleares y la presencia de tales citoquinas debe ser evitada en bioensayos posteriores, particularmente cuando se hace selección de anticuerpos antivirales. (Klinman D et al., 1996, Fearon K et al., 2003; Abel K et al., 2005).

Los Ejemplos muestran cómo se obtiene una respuesta optimizada de células B positivas para CD22 humano con una combinación de CpG2006 y IL-2 por medio del uso de concentraciones específicas de compuestos, y que una cantidad de otros agentes estimuladores conocidos (por ejemplo LPS o SAC) no proporcionan tal respuesta.

El lapso de tiempo durante el cual las células seleccionadas que secretan anticuerpo son expuestas a los agentes estimuladores es de gran importancia para el establecimiento de métodos efectivos para la inmortalización de tales células. En realidad, los Ejemplos muestran que una combinación de agentes estimuladores (CpG2006 e IL-2) ejercen un efecto máximo sobre la viabilidad y proliferación de las células en particular dentro del marco de tiempo específico (por ejemplo aproximadamente desde 2 hasta aproximadamente 4 días de estimulación). Sin embargo, pueden ser igualmente efectivas combinaciones alternativas de agentes estimuladores y marcos de tiempo para inmortalización con el EBV, o para otros agentes de inmortalización virales.

La combinación de agentes estimuladores puede ser añadida al medio de cultivo de células antes de la fase de inmortalización al mismo tiempo o en forma secuencial (por ejemplo añadiendo un primer agente estimulador inmediatamente después de la selección inicial de las células y un segundo agente estimulador horas o días después), si se demuestra que es útil para obtener una mejor respuesta de las células que secretan anticuerpo.

Los agentes estimuladores pueden ser añadidos directamente en el medio de cultivo de células a partir de soluciones patrón diluidas, o después de ser apropiadamente formuladas, por ejemplo utilizando liposomas u otros compuestos que puedan mejorar su absorción y actividad inmunoestimuladora (Gursel I et al., 2001). Los agentes estimuladores pueden también estar unidos matrices sólidas (microesferas o directamente sobre las placas de cultivo de células) permitiendo también una remoción más efectiva.

Teniendo en cuenta las observaciones hechas anteriormente sobre la importancia de aplicar los agentes estimuladores durante un período específico del tiempo y en una etapa específica de los métodos de la invención, las células que secretan anticuerpo deben ser mantenidas entonces en una forma que el agente estimulador sea eficientemente eliminado, con el propósito de evitar cualquier efecto negativo sobre la inmortalización posterior y el mantenimiento en condiciones de cultivo de células.

Por lo tanto, las células pueden ser lavadas con medio fresco una o más veces y, opcionalmente, mantenidas en medio de cultivo de células normal (por ejemplo, de uno 1 a 6 días) con el propósito de diluir adicionalmente y eliminar cualquier efecto remanente de los agentes estimuladores, que pueden ser incluso inhibidos por medio de la adición de compuestos específicos dentro del cultivo de células.

Los métodos de la invención se aplican sobre células que son adicionalmente seleccionadas con base en el isotipo del anticuerpo expresado después de la estimulación de las células y antes de exponer dichas células seleccionadas y estimuladas al agente de inmortalización (es decir entre la fase de estimulación y la fase de inmortalización).

La selección con base en el isotipo de las células debe ser realizada por medio de la aplicación de medios ya sea por selección positiva (permitiendo el aislamiento de las células específicas) o negativa (permitiendo la eliminación de las células no deseadas). Por ejemplo, dado que la mayoría de los anticuerpos terapéuticos aprobados para uso farmacéutico son IgG (Laffy E y Sodoyer R, 2005), únicamente una población de células estimuladas en forma positiva con IgG puede ser seleccionada positivamente (por medio de FACS o de separadores magnéticos de células) o por agotamiento de células que expresan IgM a partir de la población de células, y consecuentemente enriqueciendo con células que expresan IgG. Las tecnologías de separación para células que secretan anticuerpo utilizando separadores magnéticos de células o activados por fluorescencia son conocidas en la literatura (Li H et al., 1995; Traggiai E et al., 2004). Dependiendo de la fuente de células que secretan anticuerpo y de su uso final, también puede ser deseable el agotamiento (o enriquecimiento) de células que expresan IgD o IgA.

Se puede utilizar un enfoque similar para aislar células con base en la subclase específica, si se desea una selección así de precisa (por ejemplo, clasificando las células B humanas que expresan anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

La población seleccionada y estimulada de células que expresa anticuerpos que tienen isotipos específicos en esta lista ahora para ser immortalizada utilizando un agente de immortalización viral. La literatura muestra que se pueden utilizar diferentes agentes de immortalización sobre células que secretan anticuerpo, y algunas veces incluso combinadas en un proceso único con el propósito de obtener células immortalizadas que secretan anticuerpo.

Entre los agentes virales de immortalización, se debe utilizar preferiblemente un virus que infecte e immortalice células que secretan anticuerpo en los métodos de la invención. Los virus que tienen tal preferencia son comúnmente conocidos como virus linfotrópicos y se agrupan en la clase gamma de herpesvirus. Los miembros de esta familia de virus infectan linfocitos en una forma específica de la especie, y están asociados con trastornos linfoproliferativos y con el desarrollo de diferentes neoplasias malignas (Nicholas J, 2000; Rickinson A, 2001).

EBV (virus de Epstein-Barr, también conocido como herpesvirus 4), y HHV-8 (herpesvirus humano 8, también conocido como KSHV, Herpesvirus asociado con el Sarcoma de Kaposi) infectan e immortalizan linfocitos humanos. MHV-68 (herpesvirus de mívrido 68), HVS (herpesvirus Samiri), RRV (Rhesus Rhadinovirus), LCV (Linfocriptovirus de primate), EHV-2 (Herpesvirus Equino 2) HVA (Herpesvirus Ateles), y AHV-1 (Herpesvirus Alcelaphine 1) son otros herpesvirus linfotrópicos oncogénicos que tienen algunos rasgos genéticos comunes conservados entre ellos y efectos patogénicos en diferentes células huésped de mamífero. Estos virus pueden ser utilizados siempre que se apliquen los métodos de la invención sobre las células que secretan anticuerpo, obtenidas a partir de tales mamíferos.

Sin embargo, no solamente virus completos pueden immortalizar células B ya que las construcciones de ADN recombinante que contienen proteínas virales específicas obtenidas por medio de tales virus específicos y de otros virus han sido exitosamente utilizadas para immortalizar células B (Damania B 2004; Kilger E et al., 1998). Vectores similares que contienen genes virales pueden ser transducidos en células, algunas veces haciendo uso de sistemas retrovirales o de partículas tipo virus dentro de líneas de células de empaquetamiento que proporcionan todos los factores necesarios en trans para la formación de tales partículas, pueden ser utilizados también en los métodos de la invención.

La fase de immortalización puede durar entre 1 y varias horas, hasta 2 - 4 días, aunque los Ejemplos muestran que una fase de immortalización más larga puede ser perjudicial para la viabilidad celular y, en caso del EBV al menos 4 horas pueden ser suficientes para establecer poblaciones policlonales de linfoblastos (células más viables, medido por microscopía y o FACS; ver la Fig. 9) que proveen células immortalizadas que secretan anticuerpo.

Los Ejemplos muestran que las células B humanas pueden ser immortalizadas en forma eficiente utilizando sobrenadantes del EBV si se las selecciona primero para expresión de CD22, luego se las estimula durante un tiempo apropiado (aproximadamente desde 2 días hasta aproximadamente 4 días) y con una combinación apropiada de agentes estimuladores (CpG2006 e IL-2), y finalmente seleccionadas con base en un isotipo preferido (positivas o enriquecidas en IgG; negativas o agotadas en IgM).

La immortalización mediada por el EBV de células B requiere de la expresión del receptor de la superficie de la célula CD21 que se considera como el principal receptor del EBV. CD21 está presente en la mayoría de las subpoblaciones de células B y regula las respuestas de la célula B por medio de la formación de un complejo con CD19 y el receptor del antígeno de la célula B (Fearon D y Carroll M, 2000). Sin embargo, CD21 se pierde de la superficie de la célula después de una activación extensiva de las células, y a medida que se transforman en células plasmáticas. Por lo tanto, la habilidad para transformar células con EBV puede ser ayudada por la adición de agentes estimuladores de células B, pero las condiciones deben garantizar que CD21 se mantengan sobre la superficie de la célula, permitiendo la immortalización con el EBV con mayor eficiencia.

La presente invención muestra cómo poblaciones immortalizadas de células que secretan anticuerpo lo que pueden ser obtenidas en forma eficiente. En realidad, las poblaciones de cultivo de células enriquecidas por células B que son seleccionadas e immortalizadas tienen una mayor probabilidad de producir anticuerpos terapéuticos útiles, mientras mantienen su habilidad para crecer cuando se las immortaliza con el virus EBV en un estado latente, y no lítico. A diferencia de otros métodos en los cuales se puede estimular las células B para secretar IgG, el proceso de immortalización permite que la población sea "capturada" en un estado de alta capacidad proliferativa y de secreción de IgG. El sobrenadante de la población de células B immortalizadas puede ser analizado por la presencia de anticuerpos con la actividad deseada. La población de células B immortalizadas puede ser luego clonada para aislar los clones de células que secretan anticuerpo, sometida a técnicas moleculares para aislar genes de anticuerpo o almacenadas en estado congelado para futuros análisis.

La immortalización mediada por el EBV es un proceso complejo que involucra la immortalización de células B debido a las proteínas que son expresadas por el EBV, seguido por la immortalización regulada por la interacción entre el EBV y las proteínas de las células huésped (Sugimoto M et al., 2004; Bishop G e y Busch LK, 2002). En realidad, el proceso de immortalización puede ser seguido por medio de la medición de la expresión de proteínas específicas del EBV y transcritos tales como EBNA2, EBNA1, LMP2, LMP1, o los EBER (Thorley - Lawson DA, 2001). Estas proteínas pueden ser detectadas por medio de PCR, inmunofluorescencia, transferencias tipo Western, u otros

métodos que permiten la detección del ADN y las proteínas del EBV en células infectadas (Schlee M et al., 2004; Park CH et al., 2004; Humme S et al., 2003; Konishi K et al., 2001; Haan K et al., 2001).

5 La cantidad de sobrenadante del EBV que es añadida al cultivo de células puede ser aquella comúnmente indicada en la literatura (10%, 20%, 30%, o más), pero parece que los métodos pueden funcionar correctamente en condiciones en las cuales la cantidad de sobrenadante del EBV es relativamente alta (50% V/V) pero la exposición es relativamente corta (aproximadamente desde 4 hasta aproximadamente 24 horas).

10 Sin embargo es importante que el agente de inmortalización viral sea eliminado (en forma similar a lo indicado para el agente estimulador), por ejemplo lavando y cultivando la población de células en medio de cultivo de células fresco.

15 Los sobrenadantes del EBV que pueden ser utilizados en los métodos de la invención pueden ser producidos utilizando técnicas comunes para infectar cultivos de células humanas o de roedores con cualquiera de las cepas recombinantes o parcialmente suprimidas de laboratorio del EBV (así como mini-EBV y otros vectores con base en el EBV), y separando las células infectadas de los sobrenadantes enriquecidos con el EBV (Speck P et al., 1999; Oh HM et al., 2003; Bass H y Darke C, 2004; Radons J et al., 2005; US 5.798.230).

20 Las evidencias experimentales presentadas en los Ejemplos sugieren que se puede utilizar un enfoque similar con otros agentes de inmortalización. La combinación apropiada de medios de selección para purificar células que secretan anticuerpo de muestras biológicas y en condiciones de cultivo de células, de agentes de estimulación, como se definió anteriormente, y de una fase de estimulación mantenida dentro de un rango de horas o días (pero siempre separada de la fase de inmortalización) pueden mejorar la inmortalización mediada no solamente por EBV sino también por otros agentes de inmortalización virales, tal como la infección con otros virus oncogénicos y/o la transformación mediada por oncogenes.

25 Después de la eliminación del agente de inmortalización viral del cultivo de células, la población resultante de células está particularmente enriquecida (cuando se compara con otros métodos) en linfoblastos que proliferan en forma viable (ver la Fig. 9), sin las células moribundas o diferenciadas, que son no solamente inutilizables para establecer cultivos de células oligoclonal y monoclonales, sino que también liberan sustancias (tales como citoquinas, intermediarias de oxígeno reactivo) en el medio de cultivo de células que pueden afectar negativamente el crecimiento, la proliferación, y/o la secreción de anticuerpo de las células seleccionadas y estimuladas.

30 En este sentido, una población policlonal de células obtenidas de acuerdo con los métodos de la invención es particularmente útil, así como las poblaciones de células oligoclonales o monoclonales (que contienen células inmortalizadas que secretan anticuerpo) que son obtenidas por división de cada población policlonal.

35 Estas poblaciones de células pueden ser utilizadas para una serie aplicaciones, en particular relacionadas con aislamiento, caracterización y producción de anticuerpo.

40 Por ejemplo, una biblioteca de ADN que contienen secuencias de ADN que codifican anticuerpos de uno o más isotipos específicos, en donde dicha biblioteca de ADN se prepara utilizando ácidos nucleicos aislados a partir de estas poblaciones de células. Utilizando técnicas comunes de biología molecular, el ARNm o el ADN genómico pueden ser extraídos de una muestra de células, retrotranscribiendo (si es necesario) y amplificando específicamente todas las secuencias presentes en la muestra que codifica un anticuerpo, en su totalidad o solamente parcialmente (por ejemplo únicamente las regiones variables que enlazan un antígeno), como se describe en la literatura para animales inmunizados o hibridomas, a nivel de expresión de estas secuencias como proteínas recombinantes para ser seleccionadas (Gilliland LK et al., 1996; Lightwood D et al., 2006).

45 Por lo tanto, los métodos de la invención proveen poblaciones de células, y cultivos de células. También pueden obtenerse sobrenadantes de cultivos celulares, y bibliotecas de ADN que pueden ser utilizadas para identificar y producir anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseadas.

50 Alternativamente, tales productos biológicos, si se obtienen a partir de las células que secretan anticuerpo suministradas por un individuo, pueden ser utilizados para determinar las características de la respuesta inmunológica específica del isotipo como un antígeno autólogo o heterólogo, un virus, una célula bacteriana, una toxina, un parásito, o una vacuna en el individuo específico (por ejemplo, identificando los anticuerpos prevalentemente producidos y/o los antígenos prevalentemente reconocidos por el sistema inmunológico en el individuo).

55 Dado el uso extensivo y la estabilidad (como muestras congeladas) de tales productos biológicos (es decir poblaciones de células y cultivos de células de la invención, pueden ser incluidos en kits para la identificación y producción de un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseadas. Por ejemplo, el usuario del kit puede seleccionar en el laboratorio un panel de sobrenadantes

del cultivo de células o de bibliotecas de ADN por la presencia de anticuerpos monoclonales que tengan las propiedades deseadas.

5 La presente invención provee poblaciones policlonales de células inmortalizadas que secretan anticuerpo, obtenidas utilizando los métodos descritos anteriormente. Estas poblaciones de células pueden ser utilizadas en un método para producir un cultivo de células que secretan un anticuerpo monoclonal con especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados que comprende las siguientes etapas:

10 a) Dividir una población de células de la reivindicación 5 o un cultivo de células de la reivindicación 6 en cultivos de células que contiene cada uno 50 o más células;
 b) Seleccionar el sobrenadante de dichos cultivos de células para detectar aquellas que muestran la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados;
 c) Dividir los cultivos celulares que muestran especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados en cultivos o poblaciones de células;
 15 d) Repetir las etapas (b) y (c) sobre dichos cultivos de células hasta que uno o más de los cultivos de células, secretan cada uno un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de enlazamiento con el antígeno deseado, y/o la actividad biológica en el sobrenadante del cultivo de células.

20 Alternativamente, estas poblaciones de células pueden ser utilizadas en un método para producir un cultivo de células que secreten un anticuerpo monoclonal con una especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados que comprende las siguientes etapas:

25 a) Seleccionar el sobrenadante de los cultivos de células obtenido por medio de múltiples poblaciones de la reivindicación 6 para detectar una o más que secreten anticuerpos que tengan la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados;
 b) Determinar la secuencia del anticuerpo secretado por cada uno de los cultivos de células que muestran dicha actividad en el sobrenadante;
 c) Aislar los cultivos de células que secreten un anticuerpo monoclonal en el sobrenadante del cultivo de células que tenga tal actividad.
 30

Con el propósito de llevar a cabo correctamente tales métodos, las poblaciones policlonales, oligoclonales, y monoclonales de células tienen que ser mantenidas en condiciones apropiadas de cultivo de células para medir sus propiedades, en particular relacionadas con el enlazamiento con el antígeno y/o la actividad funcional del anticuerpo que ellas secretan en el sobrenadante del cultivo de células.
 35

En este sentido, la escogencia de las comisiones del cultivo de células después de la fase de inmortalización es de particular importancia, con el fin de apoyar la viabilidad, proliferación, y secreción de anticuerpo de las células inmortalizadas que secretan anticuerpo.

40 En este contexto, la escogencia de las condiciones del cultivo de células puede ser determinante para el establecimiento, selección, y crecimiento de células de cultivo oligoclonales y monoclonales. En este sentido, las reservas de células que secretan anticuerpo pueden ser mantenidas en un medio de cultivo de células que contiene uno o más agentes que estimulan el crecimiento de las células B.

45 En el caso de inmortalización mediada por el EBV, la intención con el EBV debe ser mantenida en una etapa latente, para mejorar la viabilidad, proliferación y producción de IgG de las células. Sin embargo, la escogencia de las condiciones específicas de cultivo de células puede mejorar la eficiencia de la clonación y la selección de las células de cultivo monoclonales de interés como se revisó en el pasado (James K y Bell G, 1987).

50 Un primer aspecto importante es la capa alimentadora utilizada para cultivar las células que secretan anticuerpo después de la fase de inmortalización, cuando se cultivan las células a baja densidad. La capa alimentadora puede estar constituida por preparaciones de células sanguíneas periféricas alogénicas/no alogénicas irradiadas, líneas de células linfoblastoides o de fibroblastos, linfocitos de sangre del cordón umbilical, o diferentes tipos de células embrionarias. Un ejemplo de una línea de células que tiene tales propiedades es EL4-B5, líneas de células mutantes de timoma EL4 que apoyen eficientemente el crecimiento y la proliferación de células B (Ifversen P et al., 1993; Wen et al., 1987).
 55

Un segundo aspecto importante es cómo se mantienen las células en cultivo utilizando un contenedor. Se pueden utilizar diferentes procedimientos y materiales incluido un cultivo estacionario (en pozos o frascos), un cultivo en suspensión homogénea (en un reactor agitado en forma continua o botellas en rotación), o un cultivo inmovilizado (sobre fibras huecas u otros soportes).
 60

Un tercer aspecto importante es la escogencia del medio de cultivo de células para mantener la viabilidad y el crecimiento de las células cuando se llevan a cabo tanto los métodos de la invención como el cultivo de las células después de la fase de inmortalización. Especialmente en este último período, la escogencia del medio de cultivo de
 65

células (por ejemplo IMDM o RPMI-1640) y de los nutrientes de la célula (por ejemplo aminoácidos, suero) es importante para mejorar el crecimiento y la replicación de la población de células incluso cuando se la siembra con una baja densidad, como en el cultivo de células oligoclonal.

5 Finalmente, un cuarto aspecto importante es la adición de agentes específicos que promueven el crecimiento de células B en el medio de cultivo de células, por ejemplo cualquiera de aquellos utilizados en la fase de estimulación, como se resume más arriba (por ejemplo oligonucleótidos con base en CpG, interleuquinas), o cualquier otro compuesto conocido por tener efectos promotores del crecimiento similares sobre células inmortalizadas que secretan anticuerpo, en particular después de la inmortalización con el EBV, por ejemplo 4-Hidroxinonenal (Ranjan D et al., 2005), formas de tiorredoxina (Wendel - Hansen V et al., 1994), Ligando CD40 soluble o anticuerpos agonísticos contra CD40 (WO 91/091115; WO 94/24164; Tsuchiyama L et al., 1997; Imadome K et al., 2003), o ciclosporina (Tanner J. E. y Menezes J, 1994; Chen C et al., 2001).

15 La escogencia del agente promotor de crecimiento de las células B, así como del periodo el tiempo en el cual se aplica el agente (por ejemplo únicamente en los días inmediatamente después de la inmortalización de las células) depende también del tipo de ensayo de selección que se use posteriormente. Si tal agente puede interferir, en el caso de ensayos basados en células, por medio de la modificación de la respuesta de las células objetivo, no se puede utilizar el sobrenadante del cultivo de células directamente en el ensayo, a menos que se elimine el agente específico o sustituyente del medio de cultivo de las células. Alternativamente, se pueden purificar al menos parcialmente los anticuerpos de los sobrenadantes del cultivo de células (por ejemplo por medio de precipitación de proteínas, diálisis, y/o publicación por afinidad). Sin embargo es preferible proceder con el ensayo de selección tan pronto como sea posible después de sembrar los reservorios de células, y sin la necesidad de eliminar los agentes promotores del crecimiento de las células B (o cualquier otro elemento presente en el sobrenadante del cultivo de células) por medio del establecimiento de condiciones apropiadas que no provoquen problemas en los ensayos de selección, por medio de lavado de las células, o por medio del cambio del medio de cultivo de células.

25 Se aíslan, estimulan e inmortalizan las células que producen anticuerpo de acuerdo con los métodos de la invención, y luego pueden ser mantenidas en cultivos a granel durante un número variable de días (por ejemplo de 1 hasta 10 días, o durante periodos de tiempo más largos tales como 2 - 4 semanas) antes de ser subdivididas en diferentes reservorios, representando cada uno una población de células, que son cultivadas separadamente (por ejemplo en placas de 6, 12, 24, 32, ó 96 pozos).

35 Esta población policlonal a granel de células mantenidas en condiciones de cultivo celular puede ser analizada utilizando los ensayos ya realizados sobre sueros para seleccionar el donante, o cualquier otro ensayo relevante para uso futuro de las células, con el propósito de confirmar la presencia de células. Además, se pueden colocar en viales algunas alícuotas de la población de células policlonal y almacenarlas como células congeladas (como normalmente se hacen para líneas de células establecidas de mamífero), que son descongeladas y cultivadas nuevamente posteriormente.

40 Los reservorios de células son múltiples, y pueden ser de 10 hasta de varios cientos (o incluso miles, como se muestra en el Ejemplo 3), conteniendo cada uno, estadísticamente, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o más células. Los Ejemplos muestran cómo se pueden establecer cultivos de células que secretan anticuerpos partiendo de poblaciones que contienen estadísticamente 5, 20, 50 y 100 células. Después de un número variable de días (por ejemplo de 1 hasta 10 días, o durante periodos de tiempo más largos tales como 2 - 4 semanas), estos reservorios de células deben tener anticuerpos decretados en una cantidad suficiente para su caracterización, por ejemplo por medio del uso de sobrenadantes del cultivo celular (directamente o después de una purificación parcial de los anticuerpos contenidos aquí) en un ensayo basado en células o cualquier otro ensayo de enlazamiento.

50 Los cultivos de células que contienen al menos 10^3 , 10^4 , ó 10^5 células pueden secretar una cantidad anticuerpos que se acumulan en el sobrenadante del cultivo de células (por ejemplo entre 1 y 300 $\mu\text{g/ml}$ del total o más) que pueden ser fácilmente medidos con kits comerciales de ELISA y es generalmente suficiente para llevar a cabo análisis similares *in vitro*. Además, 10^5 , 10^4 , 10^3 o incluso menos células son suficientes para obtener la secuencia del anticuerpo secretado por medio de extracción, aplicación, clonación, y secuenciación del ARNm asociado a partir de estas células (como se muestra en el Ejemplo 3).

55 De este modo, se pueden seleccionar luego alícuotas del sobrenadante de cultivo celular por su enlazamiento y/o actividad funcional en una forma de alto rendimiento, con el propósito de identificar el(los) pozo(s) positivo(s) que presenta(n) la actividad deseada, posiblemente utilizando un análisis de respuesta a la dosis con sobrenadantes de cultivo diluidos en forma serial o preparaciones de anticuerpo parcialmente purificadas (por ejemplo obtenidos por medio de cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A) en experimentos paralelos.

65 Los reservorios positivos de células (es decir aquellos que muestran la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada) pueden ser utilizados luego para generar una nueva serie de reservorios de células para restringir adicionalmente la selección del nivel del(de los) cultivo(s) de células consecuentemente aislar los cultivos de células que secretan anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de actividad deseada, al menos a nivel

del ensayo de selección inicial. Los anticuerpos monoclonales seleccionados deben ser luego reevaluados utilizando otros ensayos funcionales más demandantes y caracterizados a nivel del isotipo y de la secuencia de VH/VL, después de aislarlos de los clones inmortalizados en forma estable con el EBV utilizando las tecnologías de ADN recombinante aplicables sobre células B.

5 Esta caracterización inicial, si es corroborada por datos adicionales obtenidos utilizando modelos relevantes y experimentación clínica, puede conducir a la identificación del anticuerpo monoclonal purificado a partir de dichos sobrenadantes (o expresado posteriormente como una proteína recombinante) por tener usos diagnósticos y/o terapéuticos. En particular, si la población original de células que ha sido inmortalizada de acuerdo con los métodos de la invención era una población positiva para IgG de células B humanas, este anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG monoclonal humano que puede ser utilizado directamente para tratar infecciones y enfermedades en humanos.

15 Se puede llevar a cabo una ampliación de la producción de anticuerpo utilizando sistemas de células de mamífero, bacterianas o vegetales en los cuales las secuencias clonadas que codifican las cadenas enteras pesada y liviana (o sus regiones de enlazamiento con el antígeno únicamente) de los anticuerpos seleccionados son clonadas utilizando vectores y expresadas como proteínas recombinantes.

20 Los métodos de la invención proporcionan cultivos de células inmortalizadas oligoclonales y monoclonales de células que secretan anticuerpo que pueden ser aisladas con base en la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados, como puede determinarse por ejemplo por selección del sobrenadante del cultivo de células obtenido a partir de las poblaciones policlonales originales de células que secretan anticuerpo y los cultivos de células oligoclonales o monoclonales de células que secretan anticuerpo. Estas células pueden ser luego utilizadas para identificar y producir un anticuerpo monoclonal que tenga la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados. En este sentido, las tecnologías específicas son susceptibles de automatización, permitiendo incrementar significativamente la producción de anticuerpo a través de diferentes cultivos de células monoclonales (Chambers R, 2005).

30 Los ensayos de secreción que son utilizados con los sobrenadantes del cultivo de células y las preparaciones políticas deben ser escogidos y establecidos con el propósito de detectar los anticuerpos de interés con la precisión más alta posible. Los ensayos de selección deben contener y tener controles positivos y negativos apropiados (por ejemplo otros anticuerpos originados en otras selecciones o de origen comercial) y deben ser también lo suficientemente sensibles para medir las actividades funcionales y/o de enlazamiento en el rango de concentraciones que sean apropiadas para el uso deseado del anticuerpo (por ejemplo para uso diagnóstico, terapéutico, o profiláctico).

35 Por ejemplo, si se espera utilizar el anticuerpo como un compuesto terapéutico, el ensayo debe indicar que es detectable una actividad significativa con una concentración de anticuerpo de 100, 10, ó 1 µg/ml (o menor). Sin embargo, en esta etapa temprana de caracterización del anticuerpo, la actividad medida por el ensayo es generalmente lo suficientemente sensible para ser solamente predictiva de alguna manera de una actividad que es terapéuticamente útil. Ensayos adicionales sobre IgG purificado por recombinante son más críticos con respecto a la eficacia terapéutica y a la dosis asociada que es posiblemente administrada.

40 Se deben establecer los ensayos de selección para determinar la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica a los cuales están dirigidos los anticuerpos, y pueden hacer uso de auto/aloantígenos (humanos, de mamífero, bacterianos, virales, de parásitos, orgánicos, químicos, y cualquier otro compuesto antigénico/alergénico) que han sido purificados e incluidos en un ensayo bioquímico o basado en la célula que proveen una demostración de la especificidad de la interacción con un antígeno, o de un efecto sobre las células, tejidos, virus, o modelos animales.

50 Alternativamente, se pueden establecer también ensayos para determinar la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica hacia el complejo biológico, objetivos no purificados tales como células o tejidos (por ejemplo, migración en células endoteliales, crecimiento de células oncogénicas, etc.).

55 Los resultados de estos ensayos realizados sobre poblaciones de células policlonales o, aún mejor, oligoclonales en condiciones de cultivo de células pueden ser utilizados para seleccionar las poblaciones que deben o bien ser almacenadas en viales para congelación o usadas para la construcción de bibliotecas de ADN que contienen secuencias de ADN que codifican anticuerpos de uno o más isotipos específicos.

60 Se han descrito diferentes tecnologías en la literatura para la selección de anticuerpos *in vitro* que pueden ser relevantes para usos específicos de anticuerpos monoclonales, y que permiten también una caracterización precisa y de alto rendimiento de los anticuerpos. Junto con tecnologías más clásicas tales como inmunoprecipitación, transferencias tipo Western, ELISA, e inmunofluorescencia, enfoques más elaborados hacen uso de cultivos de células de órganos pequeños/de órganos, chips o nanopartículas de múltiples colores para ensayos de selección

efectivos (Bradbury A et al., 2003; Haab BB, 2005; Lal SP et al., 2002; Olivo P, 1996; Potera C, 2005; WO 05/82926; WO 05/003379; WO 05/83064; WO 05/76013).

5 Dependiendo del origen de las células que secretan anticuerpo y de los ensayos de selección utilizados para
seleccionar los cultivos de células monoclonales específicos y la caracterización de los anticuerpos monoclonales,
se pueden prever muchos usos diferentes de tales anticuerpos, por ejemplo como herramientas de diagnóstico (para
infecciones virales, bacterianas o parasitarias, tumores, o tipificación celular), como herramientas profilácticas o
10 terapéuticas (en particular para el tratamiento de infecciones malignas, trastornos inflamatorios o mediados por el
sistema inmunológico, o en el manejo de pacientes trasplantados), para investigar el sistema inmunológico, y en
general antígenos de relevancia clínica. Por lo tanto, estos anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales
humanos, pueden ser utilizados para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo
monoclonal o un fragmento anticuerpo, y un portador farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un
medicamento para el tratamiento de un paciente, y para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, oncogénicas,
15 autoinmunes o alérgicas en humanos.

La presente invención también provee un método para producir un anticuerpo monoclonal que comprende las
siguientes etapas:

- 20 a) Expandir un cultivo de células producido por un método descrito anteriormente; y
b) Purificar el anticuerpo monoclonal de los sobrenadantes de dicho cultivo de células.

En particular, una clara ventaja para inmortalización con el EBV es que los cultivos de células, después de haber
realizado la caracterización inicial y la validación del anticuerpo secretado, pueden ser utilizados directamente para
purificar una cantidad suficiente de anticuerpo (desde el rango de microgramos hasta miligramos) para llevar a cabo
25 una caracterización y validación más amplia del anticuerpo utilizando ensayos *in vitro* o *in vivo* (ensayos bioquímicos
adicionales basados en la célula o en el tejido, modelos de enfermedad establecidos en roedores, métodos
biofísicos para mediciones de afinidad, mapeo de epítomos, etc.).

En este punto, el cultivo de células original, después de controlar la capacidad de clonación de dicho cultivo, puede
30 ser optimizado adicionalmente por medio de la adaptación del medio de cultivo y de las condiciones para mantener
el crecimiento celular y mejorar la expresión y secreción de anticuerpo (Ling N, 2000). Se puede purificar luego el
anticuerpo a partir de los gobernantes del cultivo de células por medio de la aplicación de tecnologías conocidas a
partir de la literatura para el aislamiento de anticuerpos de mezclas complejas de proteína utilizando cromatografía
de afinidad (Nisnevitch M y Firer MA, 2001; Huse K et al., 2002). Estos métodos para purificación de anticuerpos
35 pueden basarse en la afinidad general de los anticuerpos por sustratos tales como proteína A, proteína G, o
sustratos sintéticos (Verdoliva A et al., 2002; Roque AC et al., 2004; Danczyk R et al., 2003), así como en
cromatografía de afinidad con base en el antígeno o en el epítipo (Murray A et al., 2002; Sun L et al., 2003; Jensen
LB et al., 2004). Se han elaborado otros dispositivos de separación preparativa para anticuerpos, por ejemplo con
base en electroforesis (Thomas TM et al., 2003).

40 Obviamente, se puede utilizar también un cultivo de células monoclonal para identificar las secuencias de ADN que
codifican el anticuerpo monoclonal, por amplificación clonación de las mismas en un vector, antes de proceder a la
expresión del anticuerpo recombinante en las células huésped apropiadas. La secuencia de proteína de los
anticuerpos secretados por los cultivos de células clonales seleccionados puede ser fácilmente determinada por
45 medio del aislamiento de los ácidos nucleos que codifican estos anticuerpos utilizando tecnologías de ADN
recombinante que son conocidas en la literatura (Poul M. A. et al., 1995; Jovelin F et al., 1995; Heinrichs A et al.,
1995; Dattamajumdar A. K. et al., 1996; Norderhaug L et al., 1997; Chardes T et al., 1999; Jarrin A y Andrieux A,
1999; Essono S et al., 2003).

50 Estas tecnologías pueden ser utilizadas también para caracterización estructural y funcional adicional y optimización
de anticuerpos terapéuticos (Kim SJ et al., 2005), o para la generación de vectores que permiten el suministro en
forma estable *in vivo* de anticuerpos monoclonales (Fang J et al., 2005).

En resumen, se puede preparar ARNm a partir del cultivo de células y retrotranscribirlo en una biblioteca de ADNc,
55 que puede ser utilizada como plantilla para una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que incluye iniciadores
degenerados para amplificar específicamente cadenas livianas y pesadas completas o únicamente porciones de
estas cadenas (por ejemplo las regiones variables). En el caso donde únicamente se aíslan las regiones variables
(responsables del enlazamiento del antígeno), estas secuencias pueden ser clonadas en un vector permitiendo la
fusión de esta secuencia con regiones constantes (Fc) del isotipo deseado (por ejemplo, IgG gamma I humana). Los
60 fragmentos de ADN amplificados por medio de PCR pueden ser directamente secuenciados o clonados, utilizando
sitios adaptadores o de restricción, dentro de vectores para secuenciación de la secuencia de codificación que
puede ser adaptada y clonada nuevamente en otros sectores para expresión de anticuerpos como proteínas
recombinantes.

El ARNm de las poblaciones de células policlonales u oligoclonales puede ser utilizado también para la construcción de bibliotecas de ADNc específicas para células de secretan anticuerpo de isotipos específicos que pueden hacerse disponibles, por ejemplo, como bibliotecas de despliegue de fago, bibliotecas bacterianas, bibliotecas de levadura, o cualquier otro formato de biblioteca biológica que pueda ser utilizado para la replicación y mantenimiento del ADN, en particular ADN que codifica proteínas. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de secuencias recombinantes de anticuerpo utilizando el ARNm extraído de una o más poblaciones oligoclonales de células, utilizadas para producir anticuerpos en células huésped bacterianas o eucariotas, y luego para seleccionar tales anticuerpos con el fin de identificar uno o más anticuerpos que tengan una especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados.

Una vez clonados y caracterizados, se pueden expresar los anticuerpos como proteínas recombinantes en organismos procariotas (por ejemplo *E. coli*; Sorensen H y Mortensen K, 2005; Venturi et al., 2002), plantas (Ma JK et al., 2005), o en eucariotas, en particular en líneas de células humanas, de roedor, u otras eucariotas (por ejemplo CHO, COS, HEK293) que permitan un alto nivel de expresión como células transformadas en forma transitoria o estable (Schmidt F, 2004). Esto sería requerido en particular cuando debe efectuarse la caracterización de los anticuerpos utilizando ensayos más sofisticados, incluidos ensayos *in vivo*. Se pueden seleccionar adicionalmente las células huésped con base en el nivel de expresión recombinante del anticuerpo monoclonal clonado.

En este punto, se pueden modificar las secuencias clonadas de anticuerpo utilizando PCR u otras tecnologías de ADN recombinante únicamente a nivel del ADN (por ejemplo eliminando o añadiendo sitios de restricción, optimizando el uso del codón, adaptando secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción) o tanto a nivel del ADN como de la proteína (por ejemplo añadiendo otras secuencias de proteína o modificando aminoácidos internos). Además, se pueden producir fragmentos (Fv, Fab, F(ab)' o F(ab)") o proteínas de fusión con base en estos anticuerpos utilizando tecnologías de ADN recombinante.

Por ejemplo, se pueden modificar también anticuerpos recombinantes a nivel de estructura y/o de actividad escogiendo una región Fc específica para ser fusionada con las regiones variables (Furebring C et al., 2002), por medio de la adición de secuencias de estabilización peptídicas, (WO 01/49713), por medio de la generación de fragmentos recombinantes de anticuerpo de una sola cadena (Gilliland LK et al., 1996), o por medio de la adición de radioquímicos o polímeros con residuos químicamente modificados (Chapman A et al., 1999).

Se han utilizado diferentes sistemas de vectores generando reservorios estables de líneas de células transfectadas (Aldrich T. L. et al., 2003; Bianchi A y McGrew J. T., 2003). Se ha logrado la expresión estable, optimizada, de alto nivel de anticuerpos recombinantes (Schlatter S et al., 2005; Dinnis D y James D, 2005; Kretzmer G, 2002), gracias a la optimización de las condiciones del cultivo de células (Grunberg J et al., 2003; Yoon S. K. et al., 2004) y por medio de la selección o modificación por ingeniería genética de clones con mayores niveles de producción de anticuerpo (Bohm E et al., 2004; Borth N, 2002; Chen K et al., 2001; Butler M, 2005).

La purificación de anticuerpos recombinantes/no recombinantes a partir de los cultivos de células puede ser realizada utilizando las tecnologías descritas y otras racionalizadas en la literatura (Hale G et al., 2004; Horenstein AL et al., 2003). Sin embargo, el desarrollo y el uso clínico deben basarse en la caracterización de las farmacocinéticas y farmacodinámicas del anticuerpo (Lobo E et al., 2004) y el cumplimiento de los requerimientos internacionales para la producción y control de calidad de anticuerpos monoclonales humanos, de múrido y modificados por ingeniería genética para diagnóstico terapéutico e *in vivo* en humanos (documento 3AB4a del EUDRA).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Efecto de los métodos para purificación y estimulación de células sobre la viabilidad y proliferación de células B en condiciones de cultivo de células

Materiales & métodos

Aislamiento y Mantenimiento de Células B Humanas

Se purificaron células mononucleares de sangre periférica fresca (PBMCS) a partir de sangre periférica por medio de centrifugación convencional en gradiente de densidad sobre Ficoll/Hypaque. Dependiendo del experimento, se procesaron luego las células utilizando las PBMC de un solo donante o las PBMC reunidas de cinco diferentes donantes, con el propósito de evaluar una respuesta promedio a las diferentes condiciones experimentales y para limitar las diferencias debidas a la variabilidad de los donantes.

Se aislaron células B humanas de las PBMC por medio de clasificación inmunomagnética de células utilizando la técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.) de acuerdo a la descripción hecha por el fabricante. En resumen, se suspendieron las PBMC en PBS (Solución Salina Amortiguada con Fosfato) complementado con BSA al 0,5% (Albúmina de Suero Bovino) y EDTA 2 mM (etilenediamina-N,N,N',N'-tetraacetato) y se incubó con diferentes

5 anticuerpos conjugados con microesferas (dirigidos a CD 19, a CD22, o a CD27). Se lavaron luego las células enlazadas a las microesferas y se las pasó luego sobre una columna para su selección positiva (columna LS; Miltenyi cod. 30-042-401) bajo un campo magnético. Se liberaron luego las células de las microesferas utilizando el reactivo para la liberación MultiSort de MACS (20 µl/ml) a 4°C durante 10 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec Inc.).

10 Se obtuvieron células B positivas para IgG por medio de selección negativa de células positivas para IgM por clasificación de las células o por selección magnética de células positivas para IgG utilizando la técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la selección de las células, se incubaron células B positivas para CD22 (con o sin estimulación previa) con concentraciones óptimas de IgM-FITC anti-humano (Becton Dickinson no. 555782) durante 1 hora sobre hielo. Se lavaron extensivamente las células con PBS, luego se las clasificó en células positivas para IgM y negativas para IgM bajo condiciones estériles utilizando un clasificador de células de alta velocidad (Clasificador de Células de Alto Rendimiento MoFlo®).

15 Se suspendieron las células seleccionadas y se las mantuvo en medio de cultivo para células RPMI-1640 complementado con FCS al 10% (v/v) inactivado por calor (Suero de Ternera Fetal), piruvato de sodio 1 mM, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina y se cultivó en placas de 24 pozos a 37°C y 5% de CO₂.

20 Estimulación de células B en un cultivo de células

25 Se adquirió CpG2006 (5'-TCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT-3'; SEQ ID NO: 1) a Coley Pharmaceutical Group. Se obtuvo Interleuquina 2 (IL-2) recombinante humana de Roche. Se obtuvo Interleuquina 4 (IL-4) recombinante humana de Peprotech. Se obtuvo ligando CD40 humano recombinante (fragmento soluble que contiene aminoácidos. 108-261) de R & D Systems. Se adquirieron la cepa Cowan de Staphylococcus aureus (SAC) y lipopolisacáridos (LPS) de Sigma.

Medición de la proliferación de células B por consumo de ³H-Timidina.

30 Se sembraron células (2 x 10⁶/ml) en placas de 96 pozos (50 µl/pozo) en muestras por triplicado en las condiciones de cultivo indicadas y marcadas con ³H-timidina (Timidina NET-027X, metilo-³H; actividad específica 20 Ci/mmol; Perkin-Elmer) que fue añadida (0,5 µCi/pozo) 8 - 16 horas antes del final del experimento. Se midió la asimilación de ³H-timidina recolectando las células en filtros de fibra de vidrio y se hizo recuento utilizando un contador beta (Wallach Instrument).

35 Análisis de la expresión del marcador de superficie por medio de FACS

40 Se suspendieron células (3 x 10⁵/muestra) en PBS con albúmina de suero bovino al 0,5% y se incubó durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos monoclonales seleccionados contra CD22 marcado con FITC. Después de lavar, se analizó la fluorescencia utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el software CellQuest (Becton Dickinson). Se estimó la actividad de enlazamiento de fondo de los anticuerpos monoclonales por medio de anticuerpos monoclonales de control negativo emparejados con el isotipo. El número de células analizadas fue de 10.000.

Clasificación de células con base en FACS

45 La clasificación de las células se hizo utilizando un Clasificador de Células de Alto Rendimiento MoFlo® (Dako). Se realizó la selección negativa de células que expresan IgG partiendo de células (10⁷/ml) que fueron incubadas con IgM-FITC monoclonal anti-humano (10 µl/10⁶ células; Becton Dickinson Cat. No. 555782) o IgM-FITC policlonal anti-humano (2 µl/10⁶ células; Jackson, Cat. No. 309-096-043) durante 1 hora a 4°C. Se lavaron luego las células y suspendieron (10 - 20 x 10⁶/ml) en amortiguador de selección (PBS con EDTA 5 mM, Hepes 25 mM y FCS al 1%).
50 Se separaron las células con base en el parámetro morfológico (R1): se seleccionaron las células B negativas para IgM, positivas para CD22 dentro del área R1.

Resultados

55 La literatura provee poca información comparativa en relación con el efecto de los diferentes enfoques para purificar y estimular células B sobre la viabilidad y proliferación de las células en condiciones de cultivo celular.

60 La interleuquina 2 (IL-2) fue utilizada como compuesto de referencia, dado lo bien descritos los efectos promotores del crecimiento de esta citoquina sobre las células B humanas primarias en cultivo de células (Banchereau J y Rousset F, 1992). Se hizo una primera comparación utilizando células B primarias que fueron purificadas a partir de las PBMC humanas con base en la expresión superficial de CD22 sobre su superficie, y luego co-estimuladas con estimuladores bien conocidos de células B policlonales: CpG2006, lipopolisacáridos (LPS), ligando CD40 soluble (CD40L), y cepa Cowan de Staphylococcus aureus (SAC).

Se midió una respuesta positiva a la dosis sobre la proliferación de las células cuando se añadieron LPS, SAC, y CD40L en el cultivo de células, junto con IL-2, en un ensayo de 4 días de asimilación de ³H Timidina. Sin embargo, la combinación de CpG2006, añadida en concentraciones generalmente descritas en la literatura (Bernasconi N et al., 2003; Traggiai E et al., 2004), muestra que este compuesto, cuando está combinado con IL-2, tiene un potencial marcadamente superior para inducir proliferación de células B en cultivo de células (Fig. 2). Se obtuvieron en este ensayo resultados de efectos inductores de proliferación, similares a aquellos obtenidos con una combinación de CpG2006 e IL-2, combinando CD40L soluble (en una concentración de al menos 0,5 µg/ml) con otra citoquina, IL-4 (al menos 20 ng/ml), sugiriendo que esta combinación de compuestos puede ser utilizada como un agente estimulador en los métodos de la invención, una vez se determinan las cinéticas y los efectos óptimos sobre la secreción de IgG.

Dada la magnitud del efecto identificado con una combinación de IL-2 y CpG2006, se llevó a cabo una titulación de CpG2006 para la proliferación óptima de células B y la formación de blastos utilizando un rango de concentraciones de CpG2006 de 0 hasta 2,5 µg/ml, mientras se mantiene una concentración constante de IL-2.

Se detectó una proliferación significativa inducida por CpG2006 de células B humanas positivas para CD22 en concentraciones tan bajas como 0,15 µg/ml, con una meseta lograda a razón de 0,3 µg/ml (Fig. 3A). Cuando se analizaron las mismas poblaciones de células por medio de FACS para que el porcentaje de células viables y de blastos (células grandes con alta dispersión hacia adelante) la concentración óptima de CpG2006 parece ser ligeramente mayor (entre 0,6 y 1,25 µg/ml) ya que se generan un porcentaje más alto de blastos a esas concentraciones (Fig. 3B).

Esta evidencia sobre la combinación CpG2006/IL-2, aunque confirma resultados previos que indican que pueden obtenerse efectos estimuladores de las células B de CpG2006 en concentraciones por debajo de 1 µg/ml, muestra que puede obtenerse proliferación y formación de blastos de células B estimuladas positivas para CD22 en el rango de concentraciones de CpG2006 (0,3 - 1 µg/ml).

En estos experimentos, se añadió IL-2 en una concentración constante (1000 U/ml), pero puede obtenerse una respuesta similar a la dosis con IL-2 en diferentes concentraciones, mientras que la concentración de CpG2006 es constante, para definir adicionalmente la concentración óptima de IL-2 capaz de inducir proliferación de células B humanas y la formación de blastos en presencia de CpG2006. Experimentos posteriores también mostraron que IL-2 puede ser utilizada en un rango de concentraciones entre 100 U/ml y 1000 U/ml).

De este modo, además de la escogencia de los estimuladores de células B policlonales, es importante la determinación de la concentración a la cual se debe utilizar los compuestos específicos (solos o en combinación) para obtener el efecto deseado sobre la proliferación celular. La capacidad de respuesta y de proliferación de las células B a los activadores con base en CpG2006 y a las citoquinas fue mostrada para células positivas para CD19/CD27 (Bernasconi et al., 2002; Jung J et al., 2002). Sin embargo, al menos algunos de los efectos negativos de CpG2006 sobre la viabilidad de las células B conocidos en la literatura (Hartmann et al., 2000; Klinmann D et al., 1996; Fearon K et al., 2003) parece que se reducen por medio de la aplicación de condiciones, concentraciones, y combinaciones específicas de compuestos.

El método para purificar células B primarias a partir de muestras biológicas puede ser un elemento adicional que debe ser considerado para establecer un proceso en el cual no se pongan en peligro la viabilidad y la proliferación potencial de estas células B primarias por medio de las condiciones de cultivo de células y de las manipulaciones *in vitro* en presencia de agentes estimuladores.

Se describen predominantemente dos marcadores de la superficie de la célula en la literatura por ser útiles para seleccionar positivamente células B humanas, utilizando por ejemplo soportes sólidos: CD19 y CD22. Se aplicó el protocolo de estimulación que combina IL-2 y CpG2006 sobre células B humanas purificadas ya sea con microesferas específicas para CD19 o para CD22.

Se llevó a cabo un análisis con base en FACS de la viabilidad de las células y la formación de blastos antes y después de la estimulación. La comparación entre estos dos enfoques para purificación de las células mostró claramente que, inmediatamente después de la purificación, la población de células positiva para CD22 es más homogénea que la población positiva para CD19 (Fig. 4A). Esta respuesta de las células al enfoque de purificación es incluso más evidente después de 4 días de estimulación (Fig. 4B), cuando la población positiva para CD22 tenía una frecuencia mayor de células viables y una proporción mucho mayor de células grandes activadas, que la población positiva para CD19. La mayor viabilidad de las células B purificadas con microesferas cargadas con los anticuerpos específicos para CD22, en vez de con anticuerpos específicos para CD19, puede ser debida a diferentes efectos posteriores sobre el crecimiento potencial de esas células que son ejercidos por los dos medios de selección diferentes.

Además, las células B positivas para CD22 pueden ser seleccionadas y estimuladas por medio de la aplicación de medios de selección adicionales, tales como microsferas para la selección positiva de células que expresan IgG, o cualquier otro subgrupo relevante de células B, tal como las células B de memoria positivas para CD27.

- 5 Una vez demostrado que la escogencia de medios tanto para estimulación como para selección de las células afecta la viabilidad y la proliferación de las mismas, un elemento adicional que puede estar involucrado es la cinética de la viabilidad de las células y de la respuesta de proliferación de células B humanas positivas para CD22 a la estimulación combinada o aislada con IL-2 y CpG2006.
- 10 Se midió la viabilidad y la proliferación de las células 2, 4, y 6 días después del inicio de la estimulación, mostrando que el efecto combinado de CpG2006 (1 µg/ml) y de IL-2 (1000 U/ml) proporciona una cinética distinta. La máxima incorporación de ³H-Timidina inducida solamente por CpG2006 se observa tan sólo a los 2 días en el cultivo y declina rápidamente después de eso. La cinética de la respuesta de proliferación celular solamente a IL-2 es más gradual, con incorporación creciente de ³H-Timidina hasta el día 6 de cultivo. Sin embargo, la estimulación combinada con CpG2006 y con IL-2 provee una cinética de incorporación de ³H-Timidina similar a aquella de CpG2006, pero con un efecto sorprendentemente mejorado el día 2, que continúa hasta el día 4 y declina para el día 6 de cultivo (Fig. 5). En forma paralela, se midió el número total de células viables en cultivos estimulados con CpG2006 y con IL-2, mostrando nuevamente un mayor número de células viables el día 2 y el día 4.
- 20 De este modo, la ventaja de combinar los dos agentes estimuladores es claramente más importante cuando se puede lograr, especialmente el día 4 de cultivo, un equilibrio entre los efectos activados separadamente por IL-2 y por CpG2006, que tienen cinéticas de dirección opuesta. Estos datos también sugieren la posibilidad de que se pueden ejercer efectos similares, o incluso mejores, sobre la proliferación y la viabilidad de las células que secretan anticuerpo no solamente por medio de la adquisición de agentes estimuladores no solamente en forma simultánea sino también en forma secuencial (es decir uno al comienzo de la fase de estimulación y el otro después de algunas horas o días).

Ejemplo 2: Efecto de métodos para purificación y estimulación de las células sobre la proliferación, viabilidad, y secreción de anticuerpo de las células B inmortalizadas utilizando el EBV

- 30 **Materiales & métodos**
- Selección y análisis de la proliferación y viabilidad de las células B
- 35 La selección de células B humanas, su estimulación, y el análisis fueron realizados como se indica en el Ejemplo 1, a menos que se indique otra cosa.
- Análisis de la expresión del marcador de superficie por medio de FACS
- 40 Se detectaron células positivas para CD21 por medio de inmunofluorescencia y citometría de flujo, utilizando un conjugado anti-CD21-PE (Caltag Laboratories, Cat. No. MHCD2104, lote 04061206), como se indica más arriba para CD22.
- 45 **Preparación de sobrenadantes con el Virus Epstein-Barr (EBV)**
- Se cultivaron células de linfoma de titi B95-8 que producen el EBV (ATCC No. CRL-1612; 5×10^5 /ml) en el medio para cultivo de células RPMI-1640 complementado con FCS al 10% (medio completo) durante 4 días.
- 50 Se estimularon las células B95-8 en crecimiento exponencial con ésteres de forbol 100 nM (por ejemplo PMA; Sigma) durante 2 horas (Oh HM et al., 2003), luego se las lavó muy bien con HBSS (solución salina balanceada de Hank; Sigma) para remover PMA en solución. Se cultivaron las células B95-8 estimuladas con PMA en medio para cultivo de células RPMI-1640 completo al cual se le adicionó FCS al 10% durante 48 horas, y se recolectó el sobrenadante, se lo centrifugó y filtró a través de una membrana de 0,22 µm.
- 55 Se evaluó la eficiencia de la inmortalización sobre 3 preparaciones distintas de células B positivas para CD22 de diferentes donantes de sangre. En todos los casos, se observó una rápida inmortalización y se obtuvieron líneas linfoblastoides policlonales que muestran una rápida replicación. Las inmortalizaciones llevadas a cabo en paralelo con un lote de virus preparado bajo condiciones convencionales, en ausencia de estimulación con PMA, mostró una replicación más lenta.
- 60 **Inmortalización mediada por el EBV de células B humanas estimuladas en forma negativa con IgM, en forma positiva con CD22**

Después de 4 días de estimulación con IL-2 (1000 U/ml) y con CpG2006 (1 µg/ml), se lavaron muy bien las células negativas para IgM, positivas para CD22 con medio fresco para remover los agentes estimuladores antes de ser expuestas los sobrenadante del EBV.

5 La inmortalización a granel de las células se realizó incubándolas (10^6 /ml) con sobrenadante del EBV (50% V/V en RPMI-1640 al cual se le adicionó FCS al 10%) durante un mínimo de 4 horas hasta 18 horas, y luego se las lavó con medio fresco. La proliferación y viabilidad de las células que son tratadas con sobrenadante del EBV al 50% durante 4 - 18 horas es comparable a la proliferación y viabilidad de las células que son tratadas con sobrenadante del EBV al 30% durante 7 días.

10 Se concentran luego las células (10^6 /ml en RPMI-1640 al cual se le ha añadido FCS al 10% e IL-2, 1000 U/ml) y se las siembra sobre 0.5×10^5 PBMC alogénicas irradiadas (3000 rad) por pozo en una placa de 24 pozos durante un período de 8 - 16 días.

15 Comparación cualitativa y cuantitativa de los resultados de los diferentes métodos para inmortalización de células B humanas utilizando el EBV

20 Las células B humanas han sido aisladas como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) positivas para CD22 recolectadas de 5 donantes normales por medio de expresión magnética como se describe para el Ejemplo 1 y luego se las divide en tres reservorios de células cada uno expuesto a un método diferente con base en el EBV para inmortalización de células B.

25 El método BÁSICO, se seleccionó la fracción positiva para IgG de estas células por selección de las células utilizando un seleccionado de células MoFlo de alta velocidad (MoFlo Cytomation) y FITC del IgG antihumano (Becton Dickinson). Luego, se cultivaron 8×10^5 células positivas para IgG, positivas para CD22 durante 12 horas con sobrenadante del EBV (preparado como se describió anteriormente), se las lavó y cultivó con una densidad de 1.5×10^6 células/ml durante 10 días a 37°C en medio IMDM (Gibco-BRL) complementado con L-glutamina, aminoácidos no esenciales (NEAE) y FCS al 10%, en presencia de una capa alimentadora de PBMC alogénicas irradiadas.

30 En el método COMBINADO, se aislaron 8×10^5 células positivas para IgG positivas para CD22 como en el método BÁSICO y luego se las cultivó con una densidad de 1.5×10^6 células/ml con CpG2006 (1 µg/ml) y con IL-2 (200 U/ml), y sobrenadante del EBV (preparado como se describió anteriormente) en medio IMDM (Gibco-BRL) complementado con L-glutamina, NEAE, y FCS al 10% durante 10 días a 37°C en presencia de una capa alimentadora de PBMC alogénicas irradiadas.

40 El método SECUENCIAL, las PBMC positivas para CD22 fueron primero estimuladas previamente con una combinación de CpG2006 (1 µg/ml) e IL-2 (200 U/ml), en medio IMDM (Gibco-BRL) complementado con L-glutamina, NEAE, y FCS al 10% durante 4 días a 37°C. Se lavaron luego las células con PBS y se enriquecieron las células positivas para IgG por medio de selección magnética como se describe más arriba. Se infectaron luego las células previamente estimuladas (8×10^5 PBMC positivas para IgG positivas para CD22) con sobrenadante del EBV (como en el método BÁSICO) durante 12 horas a 37°C, se las lavó y cultivó a razón de 1.5×10^6 /ml en medio IMDM (con L-glutamina, NEAE y FCS al 10%) durante 10 días a 37°C, en presencia de una capa alimentadora de PBMC alogénicas irradiadas.

45 Medición del número y viabilidad de las células por medio de yoduro de propidio y de citometría de flujo.

50 Se midió el número total de células B por medio de recuento al microscopio, y su viabilidad midiendo la exclusión del ADN que se intercala, yoduro de propidio de coloración fluorescente utilizando un citómetro de flujo de mesa FACSCalibur y el Software CellQuest (Becton Dickinson Biosciences). En resumen, se expusieron las células a temperatura ambiente al yoduro de propidio (PI, Sigma; concentración final de 2,5 µg/ml en PBS) y se las analizó por medio de citometría de flujo en un lapso de 30 minutos. Se definieron las células viables como aquellas con una alta dispersión ortogonal y hacia adelante, característica de linfocitos y linfoblastos, y excluyendo el PI. Las células que fueron coloreadas con PI, y que tienen una baja dispersión hacia adelante, representan células muertas y restos.

55 Análisis de la expresión superficial de CD23

60 Se midió la expresión de CD23 en linfoblastos viables que fueron sincronizados electrónicamente por FACS utilizando inmunofluorescencia directa (área R2) y citometría de flujo con conjugado CD23 anti-humano -PE (Becton Dickinson, catálogo no. 555711), como se describió para el Ejemplo 1.

Medición del IgG secretado

65 Se midió la secreción de IgG humano total en sobrenadantes de cultivo utilizando un ELISA (Immuno-Tek/Zeptometrics, cat. no. ZMC 0801182) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se

recolectaron sobrenadantes de cultivo de los cultivos y se almacenaron a 4°C. Se diluyeron en forma serial las muestras de sobrenadante y se las comparó con una curva estándar de IgG humano purificado incluida con el kit de ELISA. La medición refleja la cantidad total de IgG acumulada en los cultivos durante el período de cultivo de 10 días.

5

Resultados

Ya que la finalidad el proceso completo es generar células humanas inmortalizadas que secretan anticuerpo en la forma más directa posible, se escogió el EBV como agente de inmortalización, siendo bastante sencillo de establecer y aplicar utilizando sobrenadante de células infectadas por este virus. Sin embargo, se sabe bien que únicamente una fracción de las células expuestas al EBV son realmente infectadas, posiblemente debido a la expresión limitada de CD21, un receptor presente sobre la superficie de la célula que el virus utiliza para entrar a las células (Jondal y Klein, 1973; Nemerow et al., 1985; Boyd y Fecondo, 1988). Por lo tanto, era importante ver si la expresión de CD21 era afectada positiva o negativamente por el medio y las condiciones seleccionadas para la estimulación y purificación de las células descrita anteriormente.

10

15

Para este fin, se seleccionaron las cinéticas de proliferación de poblaciones de células B con base en diferentes marcadores celulares (únicamente positivos para CD22, positivos para CD22 y positivos para CD27, positivos para IgG y para CD22, positivos para CD22 y negativos para IgM) después de 4 días de estimulación con IL-2 (1000 U/ml) y CpG2006 (1 µg/ml), y midiendo la proporción de células positivas para CD21 en diferentes momentos. En todos los experimentos, se expresó CD21 en >90% de las células viables y en proliferación, confirmando también la posibilidad de utilizar un enfoque de selección doble en el contexto de los métodos de la invención.

20

25

30

Por lo tanto, después de demostrar el fuerte efecto positivo sobre la actividad de proliferación celular ejercida por medios y condiciones seleccionados para estimulación y purificación celular, se analizó cómo este enfoque puede proporcionar también una mejora en cómo responden las células B a un agente de inmortalización. En realidad, se sabe bien que, después de la exposición de las células B al EBV, una fracción sustancial de las células deja de crecer y muere dentro de la primera semana de cultivo, seguido por la reanudación de la proliferación por parte de las células inmortalizadas con el EBV (James K y Bell G, 1987). Por lo tanto, sería de gran importancia entender si una proporción adecuada de células B humanas apropiadamente estimuladas y seleccionadas no solamente puede ser inmortalizadas con EBV, sino también si estas células B inmortalizadas son más capaces de superar el periodo crítico después de la inmortalización con el EBV.

35

40

Las células B humanas negativas para IgM, positivas para CD22, con o sin estimulación previa con CpG2006 y con IL-2, fueron expuestas al sobrenadante del EBV durante la noche, lavadas, y sembradas con medio que contenía IL-2 (1000 U/ml) sobre una capa alimentadora de las PBMC alogénicas irradiadas. Se midió la proliferación de estas células durante los siguientes días. De esta forma, se puede demostrar que el tratamiento previo de células B con CpG2006 y con IL-2 resulta en un reforzamiento en la velocidad y el grado de reanudación de la proliferación de las células B después de inmortalización con el EBV. Esto se demuestra más claramente el día 7 después de la exposición a los sobrenadantes del EBV, donde casi 50% más células están presentes en cultivos previamente estimulados comparado con las células que no fueron previamente estimuladas (Fig. 6A). Esta observación fue confirmada también cuando las células B positivas para CD22 previamente estimuladas no se agotaron adicionalmente de células positivas para IgM.

45

50

55

Métodos anteriores describieron los beneficios del uso de activadores de células B policlonales durante (y no solamente antes) su inmortalización utilizando sobrenadantes del EBV, sin una etapa para eliminar los activadores del cultivo de células (WO 91/09115; Hur D et al., 2005; Traggiai E et al., 2004; Tsuchiyama L et al., 1997; WO 04/076677). Por lo tanto, se examinó el número de células en cultivos de células B negativas para IgM, positivas para CD22 que fueron expuestas durante 7 días a sobrenadantes del EBV en presencia o en ausencia del CpG2006 (1 µg/ml) y de IL-2 (1000 u/ml). Sin embargo, la presencia de CpG2006 y de IL-2 durante la inmortalización con el EBV resultó en un menor número de células B viables, como puede concluirse por medio del recuento microscópico de células (Fig. 6B). Esta reducción es ya significativa cuando se la compara con las células expuestas únicamente a los sobrenadantes del EBV, pero es aún más importante cuando se consideran los datos obtenidos con la fase de estimulación previa separada (Fig. 6A).

60

65

Estos datos sugieren que una fase distinta de estimulación en la cual se tratan cultivos de células B humanas con agentes estimuladores (utilizados solos o en combinación, tales como CpG2006 e IL-2) ejercen un efecto benéfico sobre el proceso completo de selección e inmortalización de células B utilizando el EBV. Este efecto positivo puede ser mejorado adicionalmente por medio del uso de combinaciones específicas adicionales de estimuladores (concentraciones reducidas de CpG2006 y/o de IL-2, por ejemplo) y/o limitando la fase de estimulación a un período de tiempo (por ejemplo, entre 2 y 4 días) en el cual las células B muestran una actividad óptima de proliferación y de expresión de marcadores relevantes (tales como CD21). La remoción de los agentes estimuladores antes de la fase de inmortalización es instrumental para obtener los mejores resultados de este método, siendo afectado negativamente el crecimiento y la viabilidad de las células B positivas para CD22 por la presencia continua y grande de los agentes estimuladores combinados con los sobrenadantes del EBV.

Los datos presentados anteriormente permiten demostrar no solamente la posibilidad de aplicar el método a un subgrupo específico de células B humanas determinado con base en la expresión de los marcadores de la superficie de la célula (CD21, CD23, CD24, CD27, y/o CD22, por ejemplo), sino también la factibilidad de aplicar criterios de selección adicionales relacionados con el anticuerpo secretado por las células B. En el caso presente, el uso de tecnologías para eliminar células que expresan anticuerpos de un isotipo específico (IgM) antes de proceder a la immortalización.

En realidad, se llevó a cabo un análisis con base en FACS de células B immortalizadas con el EBV agotadas en IgM, estimuladas con CpG2006/IL-2, positivas para CD22 que fue realizado 10 días después de la infección con el EBV, que confirmó que casi la totalidad de las células viables (indicadas por una dispersión mayor hacia adelante en los dos cuadrantes a mano derecha) continuaron hasta ser negativas para IgM (cuadrante inferior derecho), un fenotipo que es más deseable para la generación de anticuerpo terapéutico (Fig. 7A). Una demostración adicional de que los cultivos de células B humanas immortalizadas, de isotipo específico pueden ser generadas y mantenidas utilizando los métodos de la invención, fue obtenida analizando los sobrenadantes de las células B descritas anteriormente en un ensayo de inmunodifusión, como el realizado en la literatura por medio de inmunodifusión (Mancini G et al., 1965), confirmó que tales células B son esencialmente células de secretan IgG (Fig. 7B).

En este efecto positivo inesperado de acoplamiento de la estimulación específica de células B y de la selección de células B con base en el isotipo antes de immortalización con el EBV, puede ser mejorado adicionalmente incluyendo otros medios de selección de células B.

La eficiencia de este enfoque puede ser medido con base en la eficiencia de la clonación de células B negativas para IgM, estimuladas con CpG2006/IL-2, positivas para CD22. Las células obtenidas se reproducen *in vitro* en presencia de CpG2006 y de IL-2 durante 2 - 4 días, luego se las enriquece para la subpoblación positiva para IgG por medio de selección positiva o negativa con base en IgM. Las células B negativas para IgM, positivas para CD22 son infectadas con el EBV y clonadas limitando la dilución en placas de 96 pozos a 1 - 4 semanas después de la infección. La eficiencia de la clonación a partir del cultivo a granel puede ser evaluada dando puntaje al número de pozos que contienen células en crecimiento a cada dilución analizada del cultivo a granel (por ejemplo 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200), o a cada concentración de células por pozo (por ejemplo 1,5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, ó más células por pozo).

Una de las consideraciones más importantes cuando se lleva a cabo una immortalización con EBV es mantener la viabilidad de las células que son utilizadas para la clonación posterior. Éste es particularmente el caso cuando se pretende identificar células B específicas para el antígeno que pueden estar presentes en una frecuencia muy baja (<1:1000) en la sangre periférica. Está bien establecido que el EBV es un estimulador de células B policlonales, pero la exposición de las células B al EBV resulta en un período inicial de muerte celular en el cultivo (Sugimoto M et al., 2004).

Se han generado datos adicionales en apoyo de la invención comparando los resultados de los tres métodos de immortalización de células mediados por el EBV aplicado sobre la misma población de partida de células mononucleares de sangre periférica positivas para CD22 (PBMC) reunidas a partir de 5 donantes normales (Fig. 8A).

En el método BÁSICO, se utilizó un enfoque muy simple en el cual se expusieron células positivas para IgG, positivas para CD22 únicamente al sobrenadante que contenían al EBV durante 12 horas, se las lavó y cultivó durante 10 días en el medio apropiado para cultivo de células y sobre células alimentadoras. En el método COMBINADO, se expusieron simultáneamente células positivas para IgG, positivas para CD22 al EBV y a agentes de activación policlonales (CpG2006 y IL-2) en cultivo de células durante 10 días, en forma similar a lo que se describe en la literatura sobre el uso de tales compuestos simultáneamente (Traggiai E et al., 2004; Tsuchiyama L et al., 1997). Para el método SECUENCIAL, que es una forma posible para aplicar los métodos de la invención, se expusieron primero células positivas para CD22 a la combinación de CpG2006 y de IL-2 y se las lavó. Luego se purificaron las células positivas para IgG y se expusieron las células positivas para IgG, positivas para CD22 durante 12 horas al sobrenadante que contenía EBV, se las lavó y cultivó durante 10 días, nuevamente en el medio de cultivo de células apropiado y sobre células alimentadoras.

Ya que el número absoluto de células positivas para IgG, positivas para CD22 fue normalizado para todas las condiciones al inicio de la exposición al EBV, los datos resultantes del análisis de los cultivos de células y de los sobrenadantes medidos al final de los 10 días de cultivo deben proveer una comparación precisa de los tres métodos. En realidad, tanto el método BÁSICO como el SECUENCIAL proveen un incremento en el número total de células, resultando en casi dos veces (200%) el número de células de partida, más significativo que el obtenido utilizando el método COMBINADO que resulta en 1,5 veces (150%). Más importante, cuando se determinó el número de células viables, la población de células obtenida utilizando el método SECUENCIAL mostró un mayor número de células viables comparado tanto con el método BÁSICO como, incluso más dramáticamente, el método COMBINADO (Fig. 8B).

Entonces, se llevaron a cabo más análisis cualitativos de las poblaciones de células que fueron obtenidas utilizando los tres métodos usando criterios diferentes.

5 El análisis FACS muestra que, aparte de todas las poblaciones de células que expresan IgG, su composición es diferente, en conjunto, y en particular en el área correspondiente a los linfoblastos viables que están en crecimiento y división (siendo negativo para coloración con yoduro de propidio y con dispersión más alta hacia adelante; área R2 en la Fig. 9). La población de células que se obtiene utilizando el método SECUENCIAL parece significativamente más concentrada en esta área cuando se la compara con aquella obtenida utilizando el método BÁSICO e, incluso más sorprendente, que aquella obtenida utilizando el método COMBINADO. Las células con niveles más altos de fluorescencia debida a la acumulación de yoduro de propidio, están muertas o moribundas y tanto las poblaciones obtenidas utilizando el método BÁSICO como el COMBINADO han acumulado muchas más células de esta clase que no estarán disponibles para ninguna subclonación adicional o ensayo de selección (Fig. 9, panel izquierdo).

15 La población de linfoblastos viable presente en las muestras fue también analizada por la expresión de CD23, un marcador de la superficie de la célula que está presente en bajo nivel para la mayoría de las células B de sangre periférica pero cuya expresión comúnmente se mejora por medio de la activación (Azim T y Crawford D, 1988). Es importante poner en evidencia al índice ya que se ha demostrado una correlación directa entre la expresión de CD23 y la secreción de IgG en poblaciones de células B humanas inmortalizadas con EBV (Wroblewski J et al., 2002). El nivel de expresión de CD23 es mostrado sobre una escala logarítmica sobre el eje horizontal y el número relativo de células que expresan una cantidad cada de CD23 es mostrado sobre el eje vertical (Fig. 9, panel derecho). Es evidente que tanto el método BÁSICO como el SECUENCIAL inducen un alto nivel de expresión de CD23 en una proporción mucho mayor de células que aquella observada en la población de células obtenida con el método COMBINADO, donde muy pocas células que expresan altos niveles de CD23 son evidentes y se presenta una acumulación de células que son negativas o bajas para la expresión de CD23.

25 El análisis cualitativo de la población de células producida de acuerdo con los tres métodos descritos anteriormente a partir de la misma reserva de células B primarias, proporciona información importante relacionada con los rasgos positivos específicos de los métodos de la invención. En realidad, se ha confirmado que la separación de la inmortalización con el EBV de la estimulación policlonal, en vez de tener las células expuestas a los dos tipos de agentes simultáneamente, provee una población de células con viabilidad mejorada, expresión de CD23, y proliferación potencial. Además, el análisis FACS muestran que los métodos de la invención proveen una población de células que, en algunos aspectos, se parece a una población de células obtenida por medio del método BÁSICO, pero que tiene una frecuencia mayor de células viables, tipo blastos (ver la Fig. 9, panel izquierdo).

35 Este aspecto parece tener efectos importantes y sorprendentes adicionales sobre un elemento principal para comparar los diferentes métodos: la cantidad de IgG que las poblaciones de células acumulan en el sobrenadante del cultivo de células en un período relativamente corto del cultivo de células (8 - 10 días). Es evidente que cualquier mejora en los niveles de secreción de IgG en los sobrenadantes de estos cultivos afecta positivamente su selección de anticuerpos, ya que puede acortar el período de tiempo para el aislamiento que los cultivos de células oligoclonal o monoclonal que expresan tales anticuerpos.

40 La comparación del IgG total que se acumula en los cultivos de células obtenidos utilizando los tres métodos sobre la misma población inicial de células, que ha sido normalizada también cuantitativamente antes de la exposición al EBV, confirma adicionalmente las ventajas del método SECUENCIAL, con base en los métodos de la invención. En realidad, si los métodos BÁSICO y COMBINADO proporcionan una concentración similar de IgG total (80 - 100 µg/ml), el sobrenadante de las células resultante del método SECUENCIAL provee células que expresan IgG total en un nivel mucho más allá del rango lineal del kit de ELISA (~ 150 µg/ml) para todos los factores de dilución analizados (Fig. 10A).

50 Por lo tanto, no solamente una población policlonal de células obtenidas de acuerdo con los métodos de la invención está hecha de células que proliferan en forma activa y viable, sino que también expresa niveles de IgG total que son suficientes para llevar a cabo muchos ensayos selección diferentes, sin ninguna interferencia posible de compuestos tales como agentes estimuladores policlonales, que aceleran finalmente el proceso para determinar la presencia de células que expresan anticuerpos IgG de interés.

55 **Ejemplo 3:** Selección, estimulación, inmortalización, y detección de células B humanas que expresan anticuerpos IgG que enlazan o neutralizan objetivos terapéuticos

60 Materiales & métodos

Generación de células B humanas/inmortalizadas que expresan anticuerpos IgG

La visión general del procedimiento es suministrada en la figura 11. Las condiciones y los medios fueron aquellos definidos en los Ejemplos 1 y 2

65

Ensayo de microneutralización del CMV

5 SE siembran en placa fibroblastos de pulmón embrionario humano (HELFL) (2,0 - 2,5 x 10⁴/Pozo) sobre pozos de fondo plano de una placa de 96 pozos en 100 µl de medio esencial mínimo de Eagle (MEM) complementado con suero fetal de bovino al 10% (FCS), piruvato de sodio 1 mM (NaP), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomocina (GPS) y se cultiva durante 24 horas a 37°C.

10 Se incuban 50 µl del sobrenadante de cada cultivo de células B/clon con la cepa de laboratorio del CMV (AD169; 500 pfu en 50 µl de MEM con FCS al 5%; el volumen total de la mezcla es de 100 µl) en pozos de fondo redondo de una placa de 96 pozos durante 1 hora a 37°C. Se descarta el medio de los cultivos de HELFL y se reemplazan con la mezcla viral. Se centrifugan luego las placas a 2000 g durante 30 minutos y se incuban durante 90 minutos a 37°C en CO₂. Se descarta luego el medio, se añaden 100 µl de medio de cultivo y se mantienen los cultivos en la incubadora durante otras 72 horas.

15 El efecto de los sobrenadantes de células B sobre la actividad de infección del CMV se mide por medio de coloración del Antígeno Temprano Intermedio de CMV humano (IEA) por medio de coloración indirecta con inmunoperoxidasa de células de HELFL. Las monocapas de células se fijan con solución de acetona al 50% y metanol al 50% (se almacena a -20°C) durante 1 minuto a temperatura ambiente (RT) luego se lavan con PBS. Se permeabilizan las células en Triton X-100 al 0,1% en PBS con H₂O₂ al 1%, 5 minutos sobre hielo y luego se lava con PBS. La peroxidasa endógena es un bloqueador con PBS con metanol al 50% y H₂O₂ al 0,6%, 30 minutos a RT en la oscuridad y luego se lava con PBS. Se añadieron 50 µl de Agente Bloqueador de Proteína (Ultra Tech HRP 500-600 Test; Sistema de Detección Universal de Estreptavidina-Biotina; PN IM2391) durante 10 minutos a RT, luego se lavó con PBS. Se añaden concentraciones óptimas de anticuerpo primario (IEA de CMV antihumano; Argene Biosoft; Ref No. 11-003) a los pozos durante 60 minutos a RT. Se lavan los pozos, luego se añaden 50 µl de Anticuerpo Secundario Biotinilado (Ultra Tech HRP 500-600 Test; Sistema de Detección Universal de Estreptavidina-Biotina; Ref. No. PN IM2391) a los pozos durante 10 minutos a RT. Se lavan luego muy bien los pozos con PBS y sustrato DAB (MERCK; ref. no. 1.02924.0001) en H₂O₂ al 0,1% añadido durante 30 - 45 minutos a RT en la oscuridad. Se detiene la reacción por medio de dilución con PBS y se hace recuento al microscopio de los núcleos positivos para IEA.

30 Se analizaron también los sobrenadantes de las células B utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y la cepa VR1814 del CMV clínico.

35 Como control negativo, se utilizaron sobrenadantes de células B que contienen anticuerpos IgG irrelevantes. Como control positivo, se utilizó una preparación comercial de anticuerpos IgG humanos, derivada del suero de pacientes y específica para CMV (Cytotect; Biotest) (utilizando diluciones progresivas, partiendo en 125 µg/ml).

Ensayos con base en ELISA para la detección de proteínas para enlazamiento del CMV

40 Se realizó un primer ensayo utilizando un ensayo comercial cuantitativo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG específicos que se enlazan con un extracto de proteína de CMV en suero humano o plasma. El kit comercial de ELISA (BEIA CMV IgG Quant Kit; Biotest) ha sido utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante y validado con una mezcla comercial de anticuerpos IgG específicos para el CMV (Cytotect; Biotest) utilizado en una concentración de 50 U/ml.

45 En resumen, se colocan tiras rompibles cubiertas con una mezcla de proteína del CMV inactivado (derivado de la cepa de laboratorio AD169) en microplacas y se incuban con sobrenadantes de células B diluidos 1:81 (10 µl de sobrenadantes añadidos a 800 µl de diluyentes de la muestra del sistema BEIA), y se incuban la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de un ciclo de lavado, se añade anticuerpo IgG anti-humano monoclonal previamente diluido conjugado con peroxidasa de rábano (100 µl) y se incuban la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. Después de un segundo ciclo de lavado, se añade una solución del sustrato TMB previamente diluido (100 µl) y se incuban la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos adicionales. Se detiene la reacción utilizando la Solución de Detención (100 µl/pozo) y se mide la densidad óptica en bicromatismo a 450/620 nanómetros.

55 Se realizaron ensayos adicionales utilizando ELISA establecido en el laboratorio utilizando péptidos específicos o proteínas del CMV recombinante inmovilizados sobre superficies sólidas.

60 Se produjo una región inmunodominante gB del Antígeno del CMV recombinante como una proteína de fusión recombinante, junto con Glutathion-S-Transferasa (GST) y purificada por afinidad (purificación por afinidad con GST; Biotest Int, cat. No. R18102), o como un péptido. Se produjo también una región inmunodominante gH del Antígeno del CMV recombinante (cepa VR1814) en *E. coli* y se purificó a partir del lisado de células bacterianas con base en la afinidad por la GST. Estos ELISA fueron realizados por medio de la aplicación de un protocolo común de ELISA en un formato de 96 pozos con modificaciones menores. En resumen, se diluye el antígeno en PBS a razón de 2 µg/ml en PBS y se utilizan 50 µl de esta solución de proteína para recubrir cada uno de los pozos de una placa

de poliestireno de EIA (Nunc, cat. No. 469949) por medio de una incubación durante la noche a 4°C. Se elimina la solución de proteína y se lavan los pozos cuatro veces con 100 µl de Amortiguador de Lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween 20). Se realizó un tratamiento para bloquear enlazamiento no especificó dispensando luego 100 µl de PBS que contenía 1% de leche en cada pozo e incubando la placa durante 1 hora a 37 °C. Después de llevar a cabo cuatro ciclos de lavado con 150 µl de Amortiguador de Lavado, se dispensó una alícuota de 50 µl del sobrenadante del cultivo de células a partir de los cultivos de células en cada pozo, utilizando como control negativo 50 µl/pozo del medio para cultivo de células. Después de una incubación de 2 horas a 37 °C, se lavó la placa cuatro veces con 150 µl de Amortiguador de Lavado antes de dispensar 50 µl de un anticuerpo IgG anti-humano marcado con peroxidasa de rábano (anticuerpo IgG anti-humano de cabra, específico para Fc; Sigma, cat. No. A0170) que ha sido diluido 1: 30000 en Amortiguador de Lavado en cada pozo. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se lavó la placa cuatro veces con 150 µl de Amortiguador de Lavado antes de dispensar 50 µl/pozo de solución del sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina; Sigma, cat no. T0440). Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción cromogénica con 100 µl/pozo de Solución de Detención (ácido sulfúrico 1 N) y se emitió la densidad óptica a 450 nm.

Ensayo de enlazamiento de HSP60, con base en ELISA

Se estableció el ELISA para detectar anticuerpos que enlazan HSP-60 utilizando tiras para pozo EIA/RIA que están recubiertas con 50 µl de proteína HSP60 humana recombinante (Stressgen) diluida en NaHCO₃ 0,1 M pH 9,6 a razón de 1 µg/ml, y se las mantuvo durante la noche a temperatura ambiente. Se lavaron las tiras 3 veces con PBS con Tween-20 al 0,05% pH 7,4 se bloquean los sitios no específicos de enlazamiento con PBS con BSA al 1% y sacarosa al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavadas, se incubaron las tiras durante 3 horas a temperatura ambiente con un panel de anticuerpos primarios: una HSP60 anti-humana (diluida en PBS con BSA al 1% a razón de 5 ó 10 µg/ml; Santa Cruz Biologicals), un control negativo del isotipo IgG de ratón (5 µg/ml en PBS con BSA al 1%), un anticuerpo IgG recombinante humano no relacionado (Herceptina, 5 µg/ml), únicamente medios de cultivo para células, y sobrenadantes de células B que secretan IgG humano inmortalizadas con EBV. Después de 4 lavadas, se incubaron las tiras con IgG anti-ratón conjugado con Peroxidasa de Rábano o IgG anti-humano (Dako) diluido en PBS con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavadas, se añade solución de sustrato TMB a las tiras y se permite el desarrollo de una reacción de color a temperatura ambiente. Se lee la placa a 450 nm.

Resultados

Los métodos de la invención han sido probados sobre células B humanas obtenidas a partir de donantes cuya sangre ha probado que contenía anticuerpos que enlazan y/o neutralizan virus humanos, en particular citomegalovirus humano (CMV), un beta-herpesvirus que causa defectos de nacimiento y que es altamente patógeno para pacientes inmunocomprometidos (Landolfo S et al., 2003).

CMV ES un buen ejemplo de un objetivo viral de interés clínico que puede ser neutralizado por anticuerpos secretados naturalmente por células B humanas seleccionadas, estimuladas, e inmortalizadas de acuerdo con los métodos de la invención, como se resume brevemente en la Fig. 11. Además, contra las diferentes estrategias terapéuticas para el CMV, la administración de inmunoglobulina intravenosa del CMV (comercializada bajo el nombre de Cytotect o CytoGam) representa una solución únicamente parcialmente satisfactoria para bloquear la infección por CMV, en particular en pacientes inmunocomprometidos donde a menudo se administran conjuntamente potentes antivirales (Bonaros NE et al., 2004; Kocher AA et al., 2003; Kruger RM et al., 2003). Estas preparaciones se caracterizan por usos clínicos pero se derivan simplemente de plasma humano reunido con altos títulos de anticuerpos anti-CMV. El tratamiento de las infecciones por el CMV se beneficiaría por tener preparaciones más potentes que contienen anticuerpos monoclonales humanos purificados obtenidos por la expresión en células de mamífero aprobadas para propósitos regulatorios.

Las células B humanas que expresan anticuerpos que neutralizan al CMV pueden ser obtenidas de donantes seleccionados con base en uno o más ensayos de inmunológicos (tales como inmunotransferencias, ELISA o ELISPOT) o sobre microarreglos de antígeno, que se encuentran disponibles en el comercio (Sorin Biomedica, Italia; BioMerieux, Francia).

Se aislaron células B humanas de muestras clínicas de donantes seleccionados que proporcionan títulos más altos de anticuerpos anti-CMV en sangre, medidos por ELISA, ELISPOT o un ensayo de neutralización. Se sometieron luego las células a los métodos de la invención (Fig. 11). Se seleccionó la población resultante de células B humanas inmortalizadas con EBV, negativas para IgM, positivas para CD22 utilizando, directa o indirectamente, los sobrenadantes de los cultivos de células derivados por subclonación de la población original para detectar aquellas que contienen anticuerpos IgG que enlazan al CMV y/o que neutralizan al CMV. Las células B originales que producen estos anticuerpos pueden ser luego aisladas en etapas posteriores de subclonación, en el ámbito de clonación y secuenciación del ADN que codifica para estos anticuerpos.

Se aplicó un primer tipo de ensayo de selección primario sobre 400 subcultivos en placas de 96 pozos, conteniendo cada pozo aproximadamente cien células B. Se seleccionaron los sobrenadantes de estos pozos en un ensayo de microneutralización del CMV por la habilidad para bloquear la infección de células humanas con una cepa de laboratorio (AD169) o una cepa clínica (VR1814) de CMV humano. Cuatro de los 453 cultivos de células B seleccionados mostraron una actividad de neutralización significativa en experimentos repetidos utilizando un aislado de CMV de laboratorio y uno en particular mostró neutralización de un aislado de CMV clínico en ensayos repetidos (Fig. 12A).

Se aplicó un segundo tipo de ensayo de selección primario sobre una población de células B obtenidas de un donante seropositivo diferente para el CMV y nuevamente se la sometió a los métodos de la invención. En este caso, se detectó la reactividad específica del CMV utilizando un ELISA comercialmente disponible que es más sensible. Los subcultivos positivos para el CMV, tal como aquellos caracterizados más arriba, pueden ser utilizados para iniciar el proceso de subclonación con el fin de identificar los cultivos de células y las secuencias correspondientes a los anticuerpos responsables de las actividades de enlazamiento o de neutralización del CMV detectadas utilizando los ensayos de selección primarios.

Estos anticuerpos, como las preparaciones purificadas a partir de los sobrenadantes de células B humanas o expresadas como proteínas recombinantes, pueden ser validadas adicionalmente utilizando ensayos *in vitro* con base en la célula o el órgano conocidos en la literatura (Reinhardt B et al., 2003; Forthal DN et al., 2001; Goodrum FD et al., 2002). Además, pueden efectuarse ensayos clínicos previos relevantes en animales infectados con el CMV, en particular en modelos donde células huésped humanas pueden ser trasplantadas en roedores inmunocomprometidos (Gosselin J et al., 2005; Thomsen M et al., 2005). El antígeno / epítipo del CMV reconocido por estos anticuerpos puede ser identificado por medio de diferentes ensayos *in vitro*, por ejemplo, con base en ELISA o en Transferencias tipo Western utilizando proteínas o péptidos sintéticos truncados específicos del CMV, o en competición con otros anticuerpos específicos del CMV cuyo antígeno/epítipo es conocido (Greijer A et al., 1999; Schoppel K et al., 1996; Ohlin M et al., 1993).

Se pueden realizar ensayos de selección adicionales utilizando sobrenadantes del cultivo de células analizadas para la neutralización o el enlazamiento de citomegalovirus humano. En realidad, la disponibilidad de un gran repertorio de células que secretan IgG permite la identificación de una cantidad de IgG humano que tiene especificidad de enlazamiento por distintos epítopos del CMV o antígenos que pueden estar asociados con infección por CMV. Por ejemplo se sabe que la sangre de pacientes con aterosclerosis contiene altos niveles de anticuerpos que reconocen un fragmento de la proteína 60 de choque térmico humana (HSP60) que es similar a las proteínas del CMV. En particular, una de estas proteínas llamada US28 se expresa sobre la superficie de células endoteliales y anticuerpos que enlazan esta proteína, puede inducir apoptosis de células endoteliales, sugiriendo la idea de que la intensión con CMV puede activar una respuesta autoinmune implicada en la patogénesis de la aterosclerosis (Bason C et al., 2003).

Por lo tanto, se seleccionaron 65 reservorios de sobrenadantes del cultivo de células (conteniendo cada uno sobrenadante de 5 pozos de las células inmortalizadas con el EBV producidas partiendo de células B primarias obtenidas de un individuo seropositivo para CMV) para inmunorreactividad de HSP60 utilizando un ELISA que hace uso de HSP60 humana recombinante. Seis reservorios mostraron una reactividad estadísticamente significativa 3 veces por encima de la señal de fondo sobre el ELISA en experimentos repetidos (Fig. 12B). Estos cultivos de células que secretan anticuerpo inmortalizado pueden ser subclonados en reservorios de células, repitiendo el proceso de selección y subclonación hasta aislar los cultivos de células que secretan anticuerpos IgG monoclonales humanos que enlazan HSP60 humana.

Se aplicó un segundo tipo de ensayo de selección primario sobre una población de células B obtenidas de un donante seropositivo para CMV específico y se las sometió nuevamente a los métodos de la invención. En este caso, se detectó la reactividad específica del CMV en forma paralela utilizando un panel de ensayos diferentes con el fin de seleccionar, a partir de una población única de células B primarias, poblaciones oligoclonales o monoclonales de células inmortalizadas expresando cada una anticuerpos contra distintos epítopos específicos del CMV, y proporcionando por lo tanto una representación general de la reacción inmunológica para la infección por CMV en un individuo (Fig. 13).

Se dividió la población policlonal de células inmortalizadas con el EBV en aproximadamente 4000 reservorios para establecer cultivos de células, conteniendo cada uno estadísticamente 20 células, en placas de 96 pozos, en donde cada pozo contiene una población oligoclonal de células. Sin embargo, dada la baja frecuencia de células que producen anticuerpos específicos para un antígeno definido, cualquiera de estos cultivos de células para los cuales se detecta una IgG específica del CMV en el sobrenadante es probable que sea un cultivo de células monoclonal que expresa un anticuerpo monoclonal humano.

Los ensayos iniciales evaluaron las propiedades de enlazamiento del CMV de los anticuerpos producidos por el cultivo de células oligoclonal/monoclonal que son específicos ya sea de una mezcla de proteínas del CMV o de antígenos específicos que se sabe que son reconocidos por anticuerpos que neutralizan al CMV. Luego, aquellos

que son positivos para al menos uno de estos ensayos, fueron adicionalmente evaluados en un ensayo de microneutralización del CMV.

5 Se escogieron dos antígenos específicos del CMV para la selección inicial de las poblaciones de células oligoclonal/monoclonal: la glicoproteínas de la envoltura gB y gH. Estas proteínas, que juegan papeles cruciales tanto en la unión como en la fusión viral, son los objetivos para los anticuerpos que neutralizan al CMV humano por lo cual está disponible información más detallada. Los sueros de individuos seropositivos así como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas glicoproteínas inhiben la inversión por HCMV de los cultivos de células *in vitro*. El papel efectivo de los anticuerpos dirigidos contra gB y gH que contribuyen a la capacidad de neutralización del virus de sueros humanos ha sido claramente demostrado por la correlación entre títulos anti-gB y anti-gH y la actividad total de neutralización de sueros humanos convalecientes, así como por la caída significativa de la capacidad de neutralización de los sueros después de adsorción de anticuerpos específicos para gB y gH. (revisado en Cytomegaloviruses. Molecular Biology and Immunology. Reddehase, M. (ed.) Norfolk: Caister Academic Press (2006), y en particular Boehme K and Compton T p. 111 - 130, Mach M páginas 265 - 283).

15 Como se resume en la Fig. 13, utilizando los cultivos de células oligoclonales en los cuales proliferaron activamente en las células (aproximadamente 35% de los pozos totales en los cuales se sembraron las células), fue posible identificar pozos que contenían IgG reactivo con proteína del CMV al menos en uno de los ensayos específicos para proteínas definidas del CMV (gB- o gH-ELISA) o para un extracto total de proteína de CMV (BEIA CMV ELISA). En particular, algunos pozos contenían IgG humana que neutraliza la infección por CMV *in vitro*.

20 Entre los ocho o cultivos de células oligoclonales que fueron positivos en el BEIA CMV ELISA, únicamente el pozo llamado 9G8 contenían una IgG humana que era altamente positiva para reactividad con el CMV (Fig. 14). Se utilizó una muestra que contenían diez mil células del pozo 9G8 para generar ADNc y se amplificaron específicamente secuencias para regiones variables de cadenas liviana y pesada de IgG humana por medio de PCR. Se clonaron y secuenciaron los productos de las reacciones de aplicación y se confirmó que 9G8 es un cultivo de células monoclonales que secretan una nueva IgG humana que se enlaza con el CMV que tiene regiones variables específicas (Fig. 15). El ADN que codifica para la región variable de este anticuerpo fue utilizado también para determinar las secuencias específicas de CDR que, solo o en combinación suministrado por 9G8, puede ser utilizado para generar anticuerpos que se enlazan con el CMV.

25 Por lo tanto, un proceso que comprende los métodos de la invención para inmortalizar células que secretan anticuerpo puede permitir la identificación de nuevas secuencias de VH y VL de cultivos de células oligoclonales directamente generados a partir de la población policlonal de células que ha sido inmortalizada. Anticuerpos tales como 9G8, o cualquier proteína que contenga uno o más CDR de este anticuerpo (por ejemplo únicamente HCDR3; HCDR1, HCDR2, y HCDR3; LCDR1, LCDR2, y LCDR3) puede ser útil en aplicaciones clínicas y experimentales relacionadas con el CMV, en particular para la detección del CMV en muestras biológicas.

30 Se utilizaron también los métodos de la invención para inmortalizar células B primarias obtenidas a partir de individuos seropositivos para HIV-1, HSV-1 y/o HSV-2.

35 Por ejemplo, seis individuos seropositivos para HSV-1/HIV-1 fueron seleccionados debido a que su plasma mostró títulos altos de anticuerpos IgG que se enlazan con proteínas de HSV-1 utilizando un kit comercial de ELISA (Bouty BEIA HSV-1; cat no. 20921). Se reunieron las PBMC de estos individuos y se las inmortalizó utilizando el mismo método descrito anteriormente para las PBMC obtenidas de un donante CMV5.

40 Los 70 millones iniciales de PBMC condujeron a una población de 1,9 millones de células negativas para IgM, positivas para CD22 que aún secretaron una cantidad de anticuerpos IgG específicos para HSV-1 suficiente para ser detectada en el sobrenadante del cultivo de células no solamente utilizando el kit de ELISA sino utilizando también un ensayo *in vitro* para detectar anticuerpos que neutralizan la infección por HSV-1 que se basa en virus mutantes nulos en los cuales se reemplazó la secuencia que codifica gC por el gen lacZ (Laquerre S et al., 1998).

45 Esta población policlonal de células fue, en parte, utilizada en ensayos de selección para identificar células que secretan los anticuerpos que tienen la actividad de neutralización del HSV-1, por medio de la siembra de cientos de cultivos de células oligoclonales, conteniendo cada uno estadísticamente 50 - 100 células, inmediatamente después de la preparación del cultivo de células. Además, se congelaron en viales alícuotas del cultivo de células obtenido después de la inmortalización, como comúnmente se hace con líneas establecidas de células de mamífero. Algunos de estos viales fueron descongelados después de algunos meses, se cultivaron las células durante unos pocos días como el cultivo inicial de células policlonales, y luego se las utilizó para reparar miles de cultivos de células oligoclonales, conteniendo cada uno estadísticamente 5 células.

50 El ensayo de neutralización de HSV-1 se realizó en ambos tipos de cultivos de células oligoclonales (es decir se obtuvieron sembrando inmediatamente 50 - 100 células por pozo o se obtuvieron sembrando 5 células por pozo después de descongelar los viales que contenían alícuotas de la población de células policlonal original) y ambos

procesos condujeron a la identificación de cultivos de células oligoclonales que expresan anticuerpos IgG humanos que neutralizan HSV-1 *in vitro*.

5 En particular, las células que secretan anticuerpos que neutralizan HSV-1 obtenidas a partir del último proceso fueron identificadas en más de 20 de tales cultivos de células oligoclonales. Aunque los anticuerpos pueden llegar a ser idénticos en varios de estos cultivos de células, el mayor número de pozos positivos y la posibilidad de identificar directamente las secuencias de tales anticuerpos por medio de tecnología RT-PCR proporcionan los medios para analizar muchos cultivos de células oligoclonales alternativos (posiblemente creciendo a diferentes velocidades) para selección posterior. En realidad, no solamente se puede identificar y caracterizar la secuencia de los anticuerpos, sino que se pueden purificar directamente los anticuerpos monoclonales de interés para analizar la actividad sin la necesidad de clonarlos y expresarlos como proteínas recombinantes, acelerando la identificación de anticuerpos monoclonales humanos de mayor interés.

15 Conclusiones

Los resultados presentados en los Ejemplos muestran las múltiples ventajas de los métodos de la invención y las mejoras significativas sobre el estado del arte.

20 La secuencia apropiada de etapas de selección, estimulación, e inmortalización provee poblaciones de células policlonales particularmente útiles que, siendo aisladas con base en el isotipo pero independientemente de las propiedades específicas de enlazamiento del antígeno de los anticuerpos secretados por ellas, pueden ser utilizadas para detectar anticuerpos que tengan diferentes propiedades de las células obtenidas a partir de un solo donante, o grupos de donantes.

25 En realidad, los métodos de la invención proveen poblaciones de células monoclonales, oligoclonales o policlonales que pueden ser detectadas y seleccionadas utilizando diferentes criterios que se aplican en paralelo o en serie. Como se muestra en el Ejemplo 2, la diversidad del repertorio de anticuerpos en un individuo es capturada por los métodos de la invención de una forma que se provee un gran número de células viables y en proliferación que secretan anticuerpos en niveles altos, adecuadas para análisis de detección amplio. Además, la composición más uniforme de la población de células resultante permite el acceso, sin la necesidad de una selección o clasificación adicional de las células, a un panel extremadamente amplio (si no completo) de una diversidad de anticuerpos que es proporcionada por un donante de una manera imparcial. Como se muestra en la selección consecutiva de anti-CMV y anti-HSP60, si se realiza un ensayo específico sobre el suero para escoger al donante de las células que van a ser inmortalizadas, se puede utilizar posteriormente la población resultante de células para analizar la respuesta inmune en búsqueda de anticuerpos que tengan un gran espectro de propiedades.

35 Además, es posible generar directamente y hacer uso de los cultivos de células sembradas con muy baja densidad para la identificación de anticuerpos monoclonales. Los cultivos de células resultantes pueden ser mantenidos y seleccionados también en forma paralela ya sea para aplicar diferentes condiciones para el cultivo de células (por ejemplo células alimentadoras, medio, factores de crecimiento) o para analizar un panel de antígenos y de actividades biológicas (como se muestra para las células obtenidas del donante CMV5), pero partiendo siempre de una sola población de células.

45 Finalmente, este enfoque es adecuado para generar poblaciones policlonales de células inmortalizadas que secretan anticuerpo que pueden ser utilizadas tanto para realizar una selección contra cientos o miles de cultivos de células oligoclonales en una forma automatizada, y para generar una serie de viales para ser congelados, conteniendo cada uno una alícuota de la población de células obtenida por medio de los métodos de la invención.

50 En particular, estas células pueden ser consideradas como una biblioteca de células que secretan anticuerpo que puede ser en descongelada y analizada según se desee, como se muestra en el ejemplo que hace uso de células obtenidas a partir de un donante seropositivo para HSV-1, con el fin de analizar más extensamente, o de volver a analizar, la población de células inmortalizadas por la especificidad deseada del anticuerpo. Por lo tanto la identificación y la producción de anticuerpos monoclonales que tienen las propiedades deseadas puede ser lograda incluso para objetivos que no fueron considerados (o incluso no conocidos) cuando se escogió al donante o cuando se inmortalizaron las poblaciones de células y se almacenaron el alícuotas congeladas.

55

REFERENCIAS

- Abel K et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12: 606 - 21.
- 5 Akira S y Takeda K, *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 499 - 511.
- Aldrich T. L. et al., *Biotechnol Prog.* 2003, 19: 1433 - 8.
- Ambach A et al., *Mol Immunol.* 2004, 40: 1307 - 14.
- Azim T y Crawford D. *Int J Cancer.* 1988, 42: 23 - 8.
- Banchereau J y Rousset, F. *Adv Immunol.* 1992, 52: 125 - 262.
- 10 Bason C et al., *Lancet.* 2003, 362: 1971 - 7.
- Bass H y Darke C, *Cell Prolif.* 2004, 37: 443 - 4.
- Bernasconi N et al., *Science* 2002, 298: 2199 - 2202.
- Bernasconi N et al., *Blood* 2003, 101: 4500 - 4504.
- Bianchi A y McGrew J. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 84: 439 - 44.
- 15 Bishop G. A. y Busch L. K., *Microbes Infect.* 2002, 4: 853 - 7.
- Bohm E et al., *Biotechnol Bioeng.* 2004, 88: 699 - 706.
- Bonaros N. E. et al., *Transplantation.* 2004, 77: 890 - 7.
- Borrebaeck C et al., *PNAS* 1988; 85: 3995 - 9.
- Borrebaeck C, *J Immunol Meth* 1989, 123: 157 - 165.
- 20 Borst J et al., *Curr Opin Immunol.* 2005, 17: 275 - 81.
- Borth N, *Biotechnol Bioeng* 2002, 77: 118.
- Boyd A y Fecondo J, *Immunol Cell Biol.* 1988; 66: 159 - 165.
- Bourke E et al., *Blood.* 2003, 102: 956 - 63.
- Bradbury A. et al., *Trends Biotechnol.* 2003, 21:275 - 81 y 312 - 7
- 25 Bron D et al., *PNAS* 1984; 81: 3214 - 7.
- Butel J, *Carcinogenesis.* 2000; 21: 405 - 26.
- Butler M, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005, 68: 283 - 91.
- Carsetti R, *Methods Mol Biol.* 2004, 271: 25 - 35.
- Carter P, *Nat Rev Immunol.* 2006, 6: 343 - 57.
- Casali P et al., *Science.* 1986, 234: 476 - 9.
- 30 Chambers R, *Curr Opin Chem Biol.* 2005, 9: 46 - 50.
- Chan M et al., *J Immunol* 1986, 136: 106 - 112.
- Chapman A. P. et al., *Nat Biotechnol.* 1999, 17: 780 - 3.
- Chardes T et al., *FEBS Lett.* 1999, 452: 386 - 94.
- Chatenoud L, *Methods Mol Med.* 2005, 109: 297 - 328.
- 35 Chen C et al., *J Surg Res.* 2001, 100: 166 - 70.
- Chen K et al., *Biotechnol Bioeng.* 2001, 72: 55 - 61.
- Coban C et al., *J Exp Med.* 2005, 201: 19 - 25.
- Cognasse F. et al., *Clin Chem Lab Med.* 2005, 43: 22 - 31.
- 40 Cole S et. al., *Mol Cell Bioch* 1984, 62: 109 - 120.
- Craxton A et al., *Blood.* 2003, 101: 4464 - 71.
- Crotty S y Ahmed R. *Semin Immunol.* 2004, 16: 197-203.
- Crotty S et al., *J Immunol Meth* 2004, 286: 111 - 122.
- Damania B, *Nat Rev Microbiol.* 2004, 2: 656 - 68.
- Danczyk R et al., *Biotechnol Bioeng.* 2003, 20, 84: 215 - 23.
- 45 Dattamajumdar A. K. et al., *Immunogenetics.* 1996; 43: 141 - 51.
- Davenport C et al., *FEMS Microbiol Immunol.* 1992, 4: 335 - 43.
- Dessain S. K. et al., *J Immunol Methods.* 2004, 291: 109 - 22.
- Dinnis D y James D, *Biotechnol Bioeng.* 2005, 91: 180 - 9.
- Dunman P. M. y Nesin M, *Curr Opin Pharmacol.* 2003, 3: 486 - 96.
- 50 Eaton-Bassiri A et al., *Infect Immun.* 2004; 72: 7202 - 11.
- Essono S et al., *J Immunol Methods.* 2003; 279: 251 - 66.
- Documento EUDRA 3AB4a; <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab4aen.pdf>
- Evans L et al., *J Immunol* 1988, 140: 941 - 943,
- 55 Fang J et al., *Nat Biotechnol.* 2005, 23: 584 - 90.
- Fearon D y Carroll M, *Ann Rev Immun.* 2000; 18: 393 - 422.
- Fearon K et al., *Eur J Immunol* 2003, 33: 2114 - 2122.
- Forthal D. N. et al., *Transpl Infect Dis.* 2001, 3 Suppl 2: 31 - 4.
- Furebring C et al., *Mol Immunol.* 2002, 38: 833 - 40.
- Gay, N. J. et al., *Nat Rev Immunol.* 2006, 9: 693 - 698
- 60 Gilliland L. K. et al., *Tissue Antigens.* 1996, 47: 1 - 20.
- Giudicelli, V. et al., *Nucl. Acids Res.* 2004, 32: W435 - 440.
- Goodrum F. D. et al., *PNAS.* 2002, 99: 16255 - 60.
- Gosselin J et al., *J Immunol.* 2005, 174: 1587 - 93.
- Greijer A et al., *J Clin Microbiol.* 1999, 37: 179 - 88.
- 65 Grunberg J et al., *Biotechniques.* 2003, 34: 968 - 72.

- Gursel I et al., *J Immunol.* 2001, 167: 3324 - 8.
 Gursel M et al., *J Leukoc Biol.* 2002, 71: 813 - 20.
 Haan K et al., *J Virol.* 2001, 75: 3016 - 20.
 Haab B. B., *Mol Cell Proteomics.* 2005, 4: 377 - 83.
 5 Hale G et al., *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2004, 48: 258 - 66.
 Hartmann G et al., *J Immunol* 2000; 164: 1617 - 1624.
 Hartmann G y Krieg A, *J Immunol.* 2000, 164: 944 - 53.
 Hayashi E et al., *J Immunol.* 2005, 174(11): 6639 - 47.
 He B et al., *J Immunol.* 2004, 172: 3268 - 79.
 10 Heinrichs A et al., *J Immunol Methods.* 1995, 178: 241 - 51.
 Hemmi H et al., *Nature.* 2000; 408: 740 - 5.
 Henault M et al., *2005 J Immunol Methods.* 2005; 300: 93 - 9.
 Hoet R et al., *Nat Biotechnol* 2005, 23: 344 - 348.
 Horenstein A. L. et al., *J Immunol Methods.* 2003, 275: 99 - 112.
 15 Humme S et al., *PNAS.* 2003, 100: 10989 - 94.
 Hur D et al., *Cell Prolif.* 2005, 38: 35 - 45.
 Huse K et al., *J Biochem Biophys Methods.* 2002, 51: 217 - 31.
 Hwang W y Foote J, *Methods.* 2005, 36: 3 - 10.
 Ifversen P et al., *Hum Antibodies Hybridomas.* 1993, 4: 113 - 123.
 20 Imadome K et al., *PNAS.* 2003, 100: 7836 - 40.
 James K y Bell G, *J Immunol Methods.* 1987, 100: 5 - 40.
 Jarrin A y Andrieux A, *Methods Mol Biol.* 1999, 96: 21 - 8.
 Jensen L. B. et al., *J Immunol Methods.* 2004, 284: 45 - 54.
 Jondal M y Klein G, *J Exp Med* 1973, 138: 1365 - 1378.
 25 Jovelin F et al., *Biotechniques.* 1995, 1.9: 378 - 82.
 Jung J et al., *J Immunol* 2002, 169: 2368 - 2373.
 Kandimalla E. R. et al., *PNAS.* 2005, 102: 6925 - 30.
 Keller M. A. y Stiehm ER, *Clin Microbiol Rev.* 2000, 13: 602 - 14.
 Kellermann S y Green L, *Curr Opin Biotechnol.* 2002, 13: 593 - 7.
 30 Kern F et al., *Trends Immunol.* 2005, 26: 477 - 84.
 Kilger E et al., *EMBO J.* 1998, 17: 1700 - 9.
 Kim S. J. et al., *Mol Cells.* 2005, 20: 17 - 29.
 Klinman D et al., *PNAS* 1996, 93: 2879 - 2883.
 Klinman D, *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 249 - 58.
 35 Kocher A. A. et al., *J Heart Lung Transpl.* 2003, 22: 250 - 7.
 Kohler G y Milstein C, *Nature* 1975, 256: 495 - 497.
 Konishi K et al., *J Gen Virol.* 2001, 82: 1451 - 6.
 Kretzmer G, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002, 59: 135 - 42.
 40 Krieg A et al., *Nature.* 1995; 374: 546 - 9.
 Krieg A, *Annu Rev Immunol.* 2002, 20: 709 - 60.
 Kruger R. M. et al., *J Heart Lung Transpl.* 2003, 22: 754 - 63.
 Laffy E y Sodoyer R, *Hum. Antibodies.* 2005, 14: 33 - 55.
 Lal S. P. et al., *Drug Discov Today.* 2002, 7(Suppl): S 143 - 9.
 Landolfo S et al., *Pharmacol Ther.* 2003, 98: 269 - 97.
 45 Laquerre S et al., *J Virol.* 1998, 72: 6119 - 30.
 Laroche-Traineau J et al., *Hum Antib Hydrid.* 1994, 5 165 - 177.
 Li H et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 207: 985 - 93.
 Li J et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006, 103: 3557 - 62.
 Lightwood D et al., *J Immunol Methods.* 2006, 316: 133 - 43.
 50 Ling N, *J Immunol Methods.* 2000, 238: 3 - 15.
 Lobo E et al., *J Pharm Sci.* 2004, 93: 2645 - 68.
 Ma J. K. et al., *Vaccine.* 2005, 23: 1814 - 8.
 Mancini G et al., *Immunochemistry.* 1965, 2: 235 - 254.
 Mancini N et al., *New Microbiol.* 2004, 27: 315 - 28.
 55 McHeyzer-Williams L y McHeyzer-Williams M, *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 487 - 513.
 Mezzasoma L et al., *Clin Chem.* 2002; 48: 121 - 30.
 Morgenthaler N et al., *J. Clin Endocrinology.* 1996, 81: 3155 - 3161.
 Mulder A et al., *Hum Immunol.* 1993; 36: 186 - 92.
 Murray A et al., *J Chromatogr Sci.* 2002, 40: 343 - 9.
 60 Nemerow G et al., *J Virol* 1985, 55: 347 - 351.
 Nicholas J, *Mol Pathol.* 2000, 53: 222 - 37.
 Niedbala W y Kurpisz M, *Immunol Lett.* 1993, 35: 93 - 100.
 Niedbala W y Stott D, *Hybridoma* 1998; 17: 299 - 304.
 Nisnevitch M y Firer MA, *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 49: 467 - 80.
 65 Nitschke L, *Curr Opin Immunol.* 2005, 17: 290 - 7.

- Norderhaug L et al., J Immunol Methods. 1997, 204: 77 - 87.
 Oh H et al., Cell Prolif. 2003, 36: 191 - 97.
 Ohlin M et al., J Virol. 1993, 67: 703 - 10.
 5 Olivo P, Clin Microbiol Rev. 1996, 9: 321 - 34.
 Olsson L y Kaplan H, PNAS 1980, 77: 5429 - 5431.
 Park CH et al., J Cell Biochem. 2004, 91: 777 - 85.
 Pavlou A y Belsey M, Eur J Pharm Biopharm. 2005; 59: 389 - 96.
 Peng S, Curr Opin Immunol. 2005, 17: 230 - 6.
 Posner M et al., J Immunol. 1991; 146: 4325 - 4332.
 10 Potera C, Genetic Eng News. 2005, 25, 10 (available at http://www.trellisbio.com/article_GEN_051505.pdf)
 Poul M. A. et al., Immunotechnology. 1995, 1: 189 - 96.
 Radons J et al., J Immunol Methods. 2005, 303: 135 - 41.
 Raff H et al., J Exp Med. 1988, 168: 905 - 17.
 Ranjan D et al., Cell Biochem Funct. 2006, 24: 147 - 152.
 15 Reinhardt B et al., J Virol Methods. 2003, 109: 1 - 9.
 Rickinson A, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001, 356: 595 - 604
 Roque A. C. et al., Biotechnol Prog. 2004, 20: 639 - 5
 Schlatter S et al., Biotechnol Prog. 2005, 21: 122 - 33.
 Schlee M et al., J Virol. 2004, 78: 3941 - 52.
 20 Schmidt F, Appl Microbiol Biotechnol. 2004, 65: 363 - 72
 Schneider P, Curr Opin Immunol. 2005, 17: 282 - 9.
 Schoppel K et al., Virology. 1996, 216: 133 - 45.
 Sen G et al., Cell Immunol. 2004; 232 : 64 - 74.
 Sorensen H y Mortensen K, J Biotech. 2005, 115: 113 - 28.
 25 Speck P et al., J Gen Virol. 1999, 80: 2193 - 203.
 Steenbakkens P et al., Hum Antibod Hybrid. 1993, 4: 166 - 173.
 Steenbakkens P et al., Mol Biol Rep. 1994, 19: 125 - 134.
 Sugimoto M et al., Cancer Res. 2004, 64: 3361 - 4.
 Sun L et al., J Immunol. Methods. 2003, 282: 45 - 52.
 30 Takeshita F et al., J Immunol. 2001, 167: 3555 - 8.
 Tangye S et al., J Immunol. 2003, 170: 261 - 9.
 Tanner J. E. y Menezes J, Blood. 1994, 84: 3956 - 64.
 Thomas T. M. et al., Hybrid Hybridomics. 2003, 22: 47 - 53.
 Thomsen M et al., Tissue Antigens. 2005, 66: 73 - 82.
 35 Thorley-Lawson D. A., Nat Rev Immunol. 2001, 1(1): 75 - 82.
 Torres M et al., J Immunol. 2005, 174: 2132 - 42.
 Traggiai E et al., Nat Med 2004, 10: 871 - 875.
 Tsuchiyama L et al., Hum Antibodies. 1997, 8: 43 - 7.
 40 Ulevitch R, Nat Rev Immun. 2004, 4: 512 - 520.
 Venturi M et al., J Mol Biol 2002, 315: 1 - 8
 Verdoliva A et al., J Immunol Methods. 2002, 271: 77 - 8.
 Viau M y Zouali M, Clin Immunol. 2005, 114: 17 - 26.
 Wallis R et al., J Clin Invest 1989, 84: 214 - 219.
 Wen et al., Eur J Immunol. 1987, 17: 887 - 92.
 45 Wendel-Hansen V et al., Leukemia. 1994, 8: 476 - 84.
 Wroblewski J et al., J Immunol Meth. 2002, 264: 19 - 28
 Yamaguchi H et al., PNAS 1987, 84: 2416 - 2420.
 Yoon S. K. et al., Biotechnol Prog. 2004, 20: 1683 - 8.

50 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Ribovax Biotechnologies S.A.
 <120> MÉTODOS PARA OBTENER CÉLULAS INMORTALIZADAS QUE SECRETAN ANTICUERPO
 <130> PAF03-wo
 55 <150> PCT / EP2005 / 056871
 <151> 2005-12-16
 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 60 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido CpG
 65 <400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt
24

5 <210> 2
<211> 528
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 2

atggggtcaa ccgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag
60

gtgcagctgg tgcagtctgg ggcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
120

tgtaagggtt ctggatacac ctttgacagc tactggatcg gctgggtgcg ccagatgcc
180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcacc taccctggtg actctgatac cagatacagc
240

ccatccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagcac cgcctctttg
300

cagtggagca gcctgagggc ctggacacc gccatgtatt actgtgagag acatacatac
360

cccggaccga atagtggcta cgactacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc
420

gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
480

10

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttc
528

15 <210> 3
<211> 176
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Asp Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Ser Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Gly Pro Asn Ser Gly Tyr Asp
115 120 125

Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175

<210> 4
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

10 <210> 5

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

5

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

10

His Thr Tyr Pro Gly Pro Asn Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Glu Tyr
 1 5 10 15

15

<210> 7
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

20

ttcctcctgc tactctggct cccagatacc accggagaaa ttgtggtgac acagtctcca
 60

gccaccctgt ctttgtctcc aggagaaaga gtcaccctct cctgcagggc cagtcagagt
 120

gtttacaact acttagcctg gtaccaacag aaacctggcc aggtctcccag gtcctcctc
 180

tatgatgcat ccaacagggc cactggcctc ccagccaggt tcagtggcag tgggtctggg
 240

acagacttca ctctcaccat cagcagccta gagcctgaag attttgcagt ttattactgt
 300

cagctgcgtc gagggacggt cggccaaggg accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct
 360

gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct
 420

ggt
 423

25

<210> 8
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu
 1 5 10 15

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr
 20 25 30

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
 35 40 45

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
 50 55 60

Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Gln Leu Arg Arg Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 100 105 110

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 130 135 140

5 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

20 <210> 11

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para inmortalización de una población de células que secreta anticuerpos de uno o más isotipos específicos que comprende las siguientes etapas en secuencia:
- 10 a) Seleccionar la población de células que expresa anticuerpos a partir de una o más muestras biológicas en una forma independiente del antígeno y sobre la base de la expresión de al menos un marcador de la superficie de la célula;
- 15 b) Estimular dicha población de células seleccionadas con al menos un agente de estimulación en condiciones de cultivo de células;
- c) Eliminar dicho agente de estimulación del cultivo de células;
- d) Seleccionar la población de células estimulada que expresa anticuerpos de uno o más isotipos a partir de dicho cultivo de células;
- 20 e) Exponer dicha población de células seleccionadas y estimuladas al agente de inmortalización en las condiciones de cultivo de células;
- f) Eliminar dicho agente de inmortalización de dicho cultivo de células;
- En donde el agente de inmortalización es un agente de inmortalización del tipo viral.
2. Un método de la reivindicación 1, en donde dicha población de células de la etapa (a) son células B humanas y el marcador de la superficie de la célula es CD22, CD19, o CD27.
3. Un método de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho agente estimulador se escoge entre:
- 25 a) Una combinación de un oligonucleótido con base en CpG y una citoquina;
- b) Una combinación de un agonista de un receptor de la membrana celular de la familia del receptor TNF y una citoquina;
- Y el agente de inmortalización viral es el virus de Epstein-Barr.
- 30 4. Un método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en donde la población de células de la etapa d) expresa anticuerpos IgG.
5. Una población de células obtenida por medio de un método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4.
- 35 6. Un cultivo de células que contiene una población de células de la reivindicación 5.
7. El uso de una población de células de la reivindicación 5, o de un cultivo de células de la reivindicación 6, para identificar y producir un anticuerpo monoclonal que tenga la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados.
- 40 8. El uso de cultivos de células de una población de células de la reivindicación 5, o de un cultivo de células de la reivindicación 6, que se obtienen de las células que secretan anticuerpo suministradas por un individuo para determinar las características de la respuesta inmune, específica del isotipo a un antígeno autólogo o heterólogo, un virus, una célula bacteriana, una toxina, una célula parásita, o una vacuna en dicho individuo.
- 45 9. Un kit para identificar y producir un anticuerpo monoclonal que tenga la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados, en donde dicho kit contiene una población de células de la reivindicación 5, o un cultivo de células de la reivindicación 6.
- 50 10. Un método para producir un cultivo de células que secreta un anticuerpo monoclonal que tenga la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados que comprende las siguientes etapas:
- a) Dividir una población de células obtenida por medio de un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un cultivo de células de la reivindicación 6 en cultivos de células que contengan cada uno 20 o más células;
- 55 b) Seleccionar el sobrenadante de dichos cultivos de células para detectar aquellas que muestran la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados;
- c) Dividir los cultivos de células que muestren especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseados en cultivos o poblaciones de células;
- d) Repetir las etapas (b) y (c) sobre dichos cultivos de células hasta aislar uno o más de los cultivos de células, que secretan cada uno un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de enlazamiento con el antígeno, y/o la actividad biológica deseados en el sobrenadante de células.
- 60 11. Un método para producir un cultivo de células que secreta un anticuerpo monoclonal que tenga la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseados que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Seleccionar el sobrenadante de los cultivos de células obtenido dividiendo una población de células obtenida por medio de un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un cultivo de células de la reivindicación 6 en poblaciones múltiples de células que contengan 20 o más de tales células para detectar una o más de dichas poblaciones de células que secreten anticuerpos que tengan la especificidad por el antígeno y/o la actividad biológica deseada;
- b) Determinar la secuencia del anticuerpo secretado por cada uno de los cultivos de células que muestran dicha actividad en el sobrenadante;
- c) Aislar los cultivos de células que secreten un anticuerpo monoclonal que tenga tal actividad.
- 10 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 que comprende:
- a) La extensión de dicho cultivo de células; y
- b) Purificar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante de dicho cultivo de células.
- 15 13. Un método de cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 12, en donde la especificidad de enlazamiento con el antígeno y/o la actividad biológica deseada está dirigida a un antígeno humano, de mamífero, viral, bacteriano, de una planta, parásito, orgánico, o inorgánico.

Fig. 1

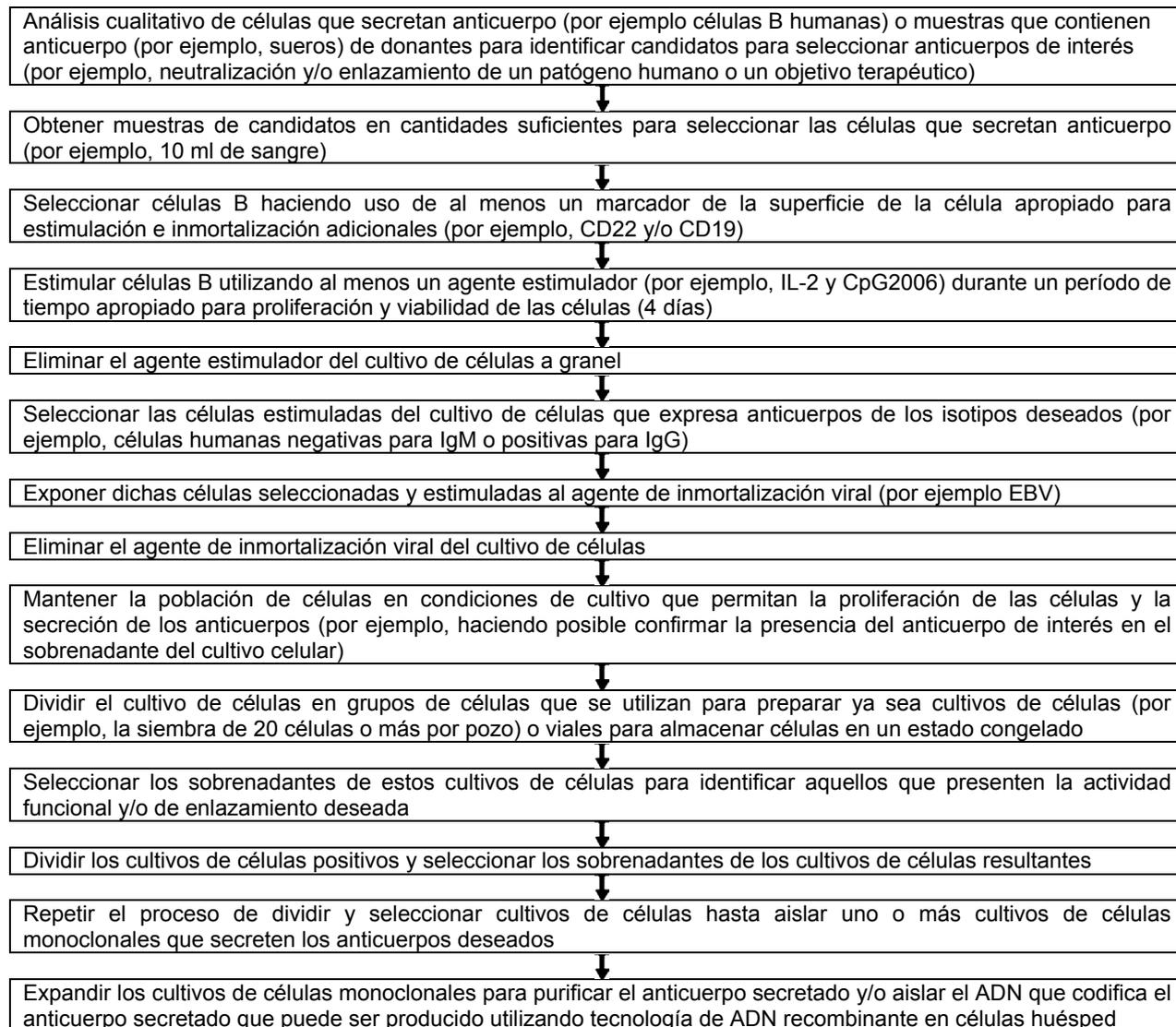


Fig. 2

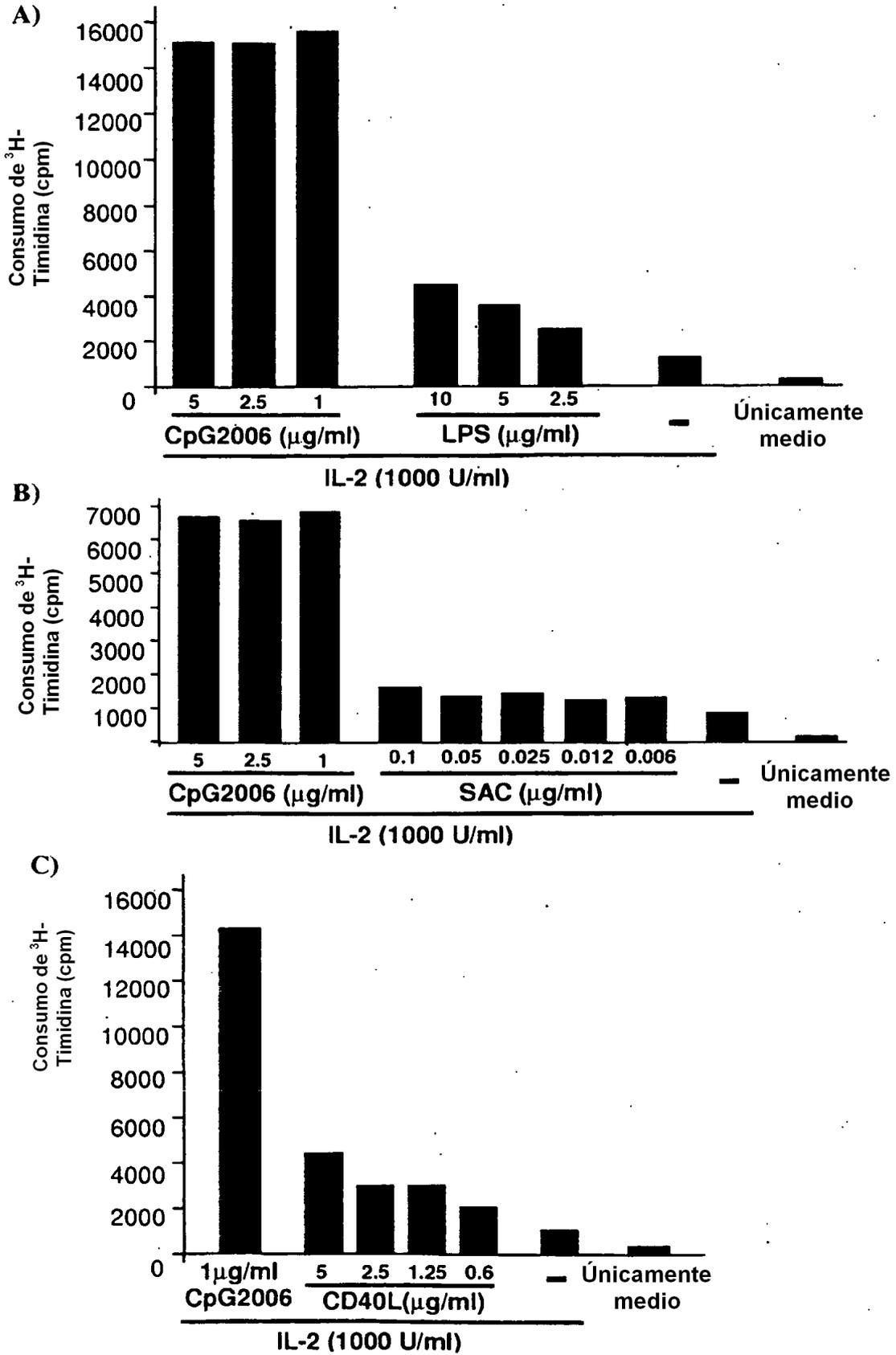


Fig. 3

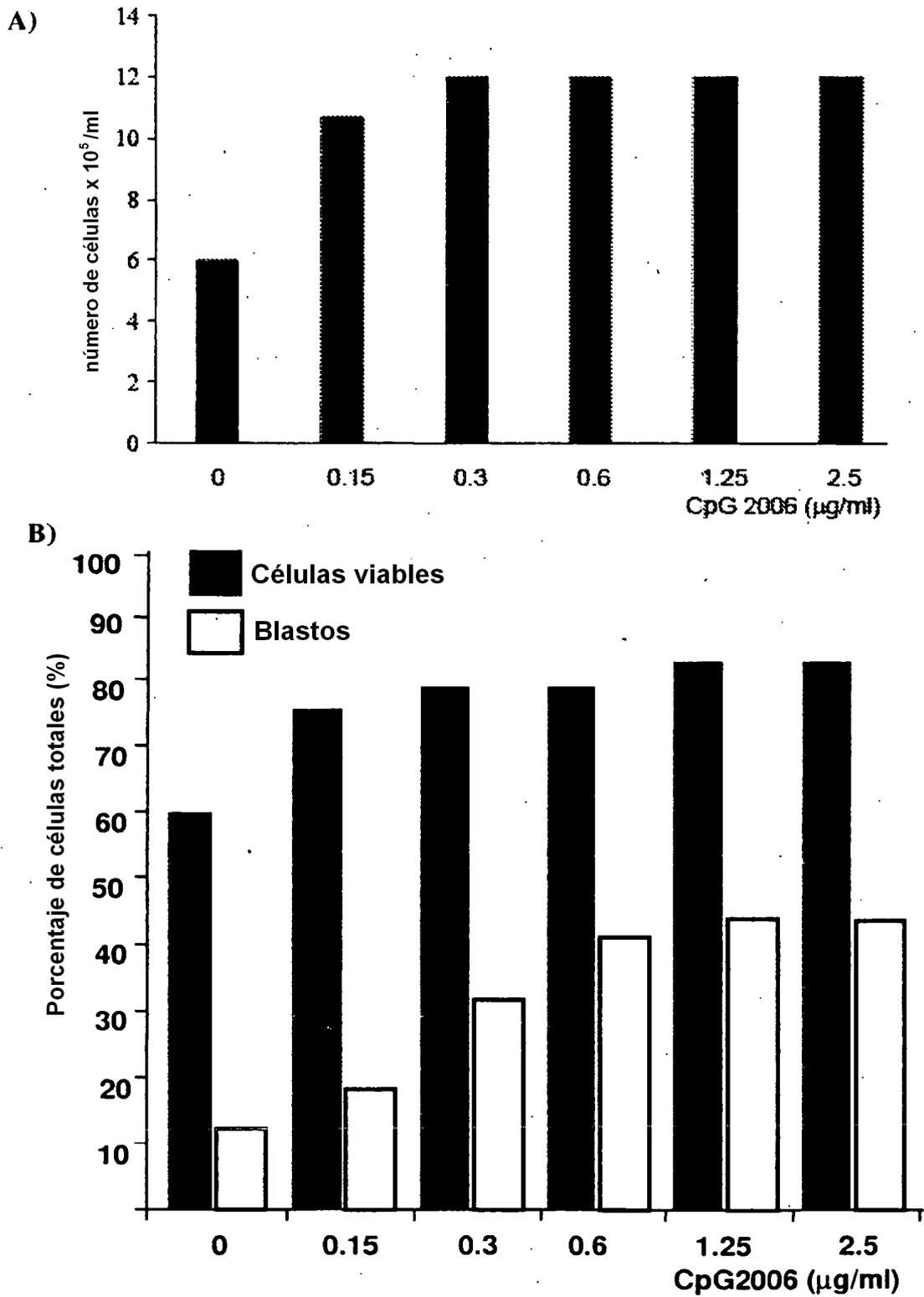
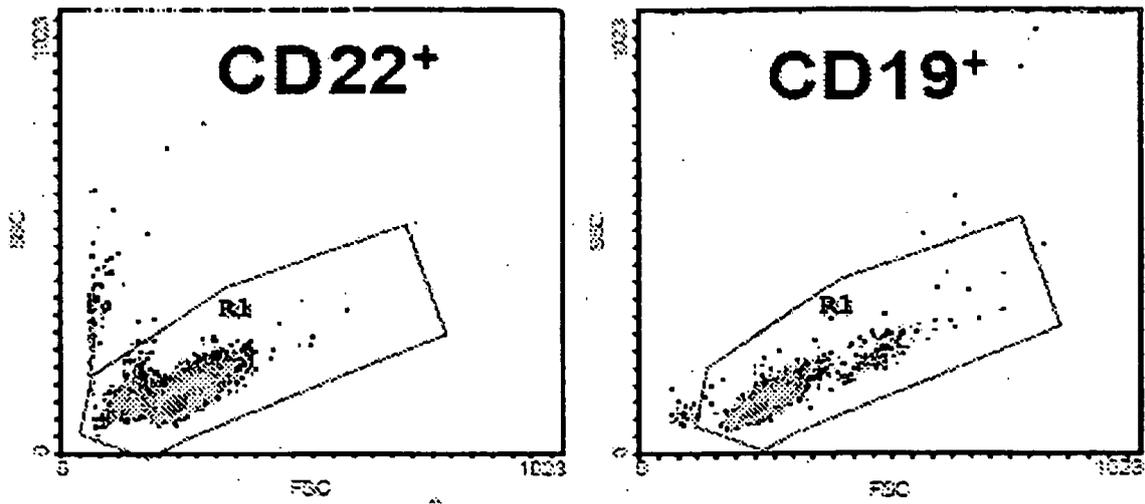


Fig. 4

A)



B)

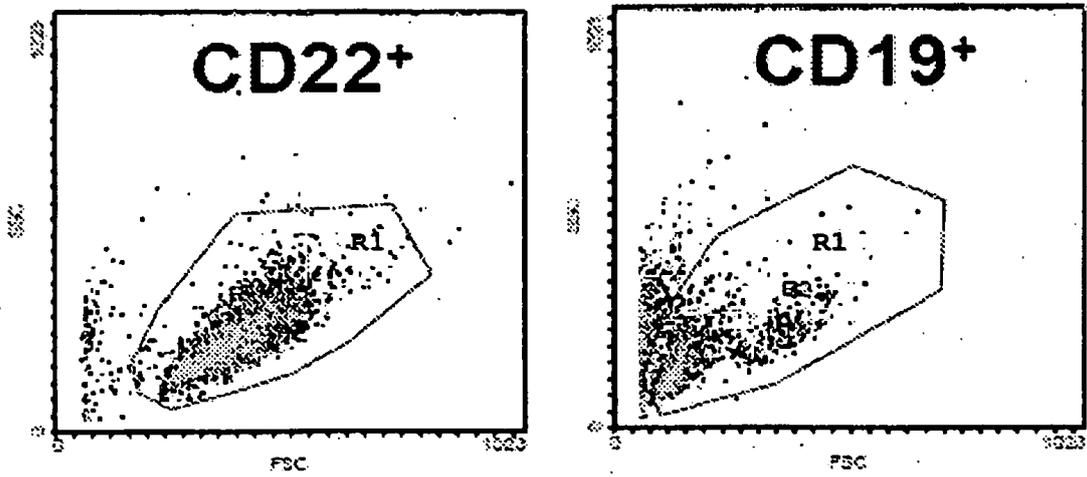


Fig. 5

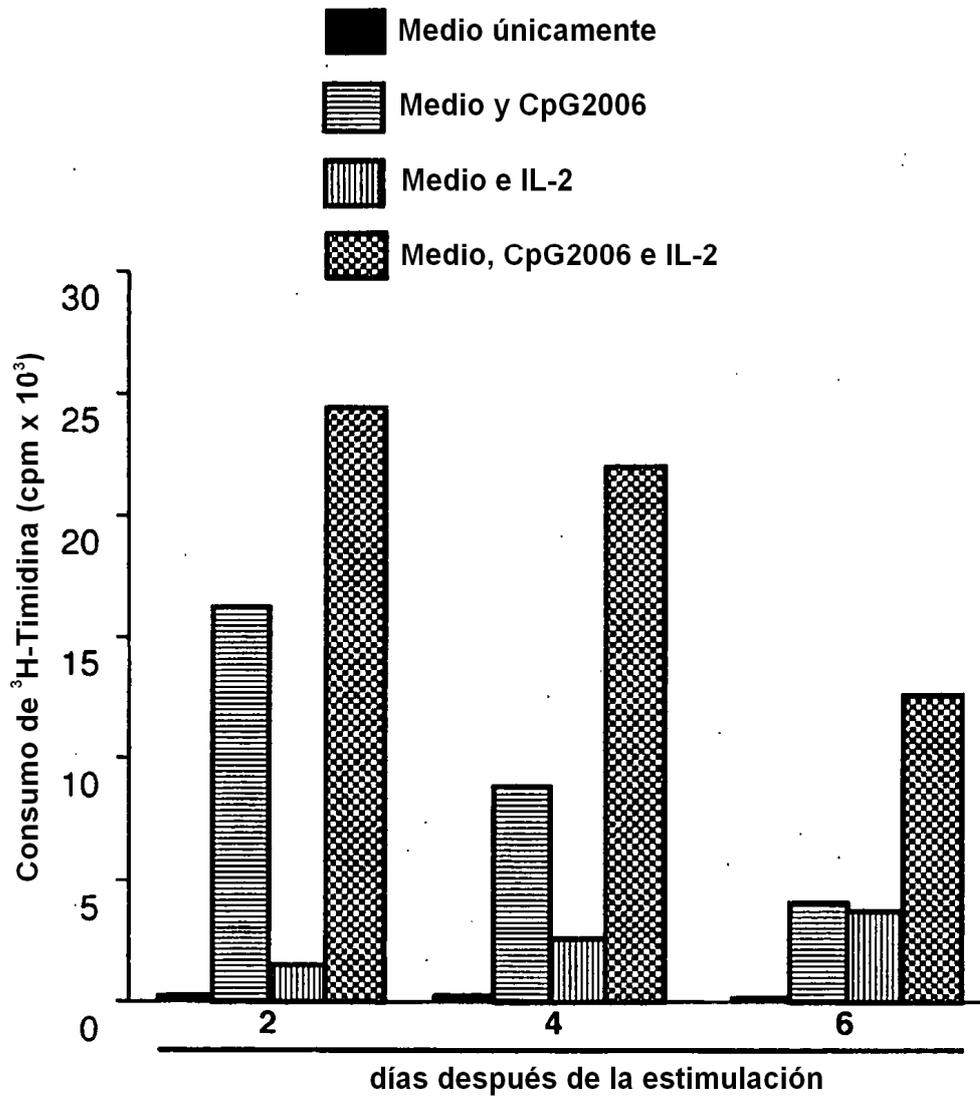
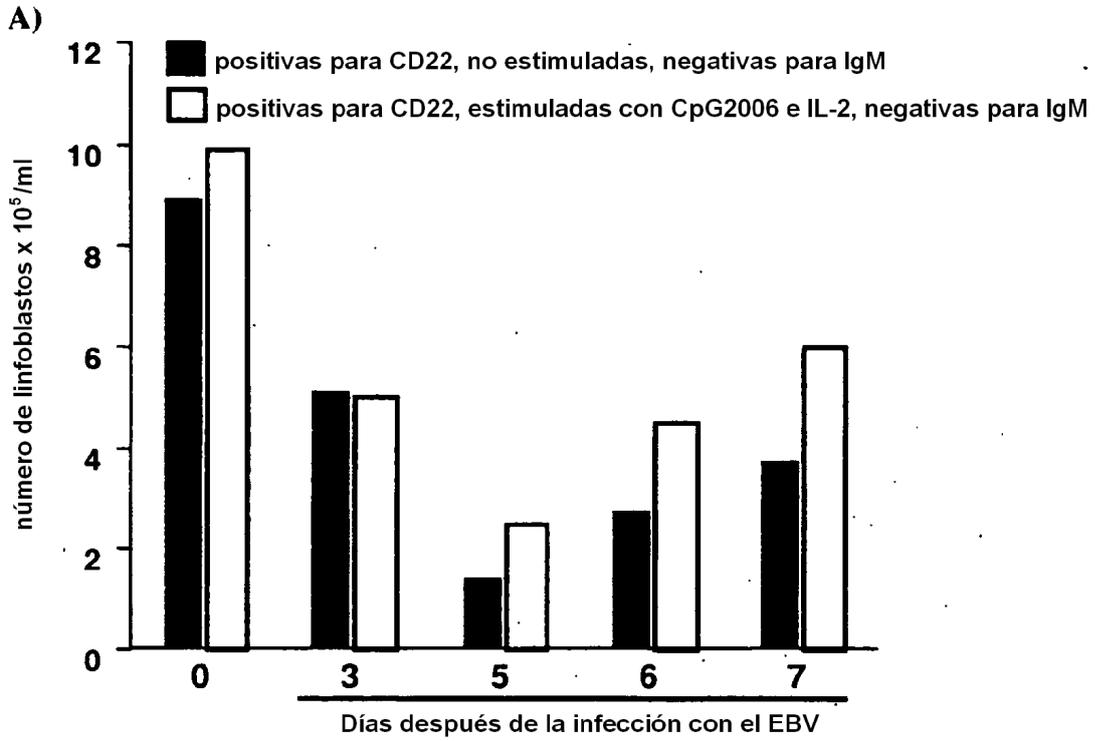


Fig. 6



B)

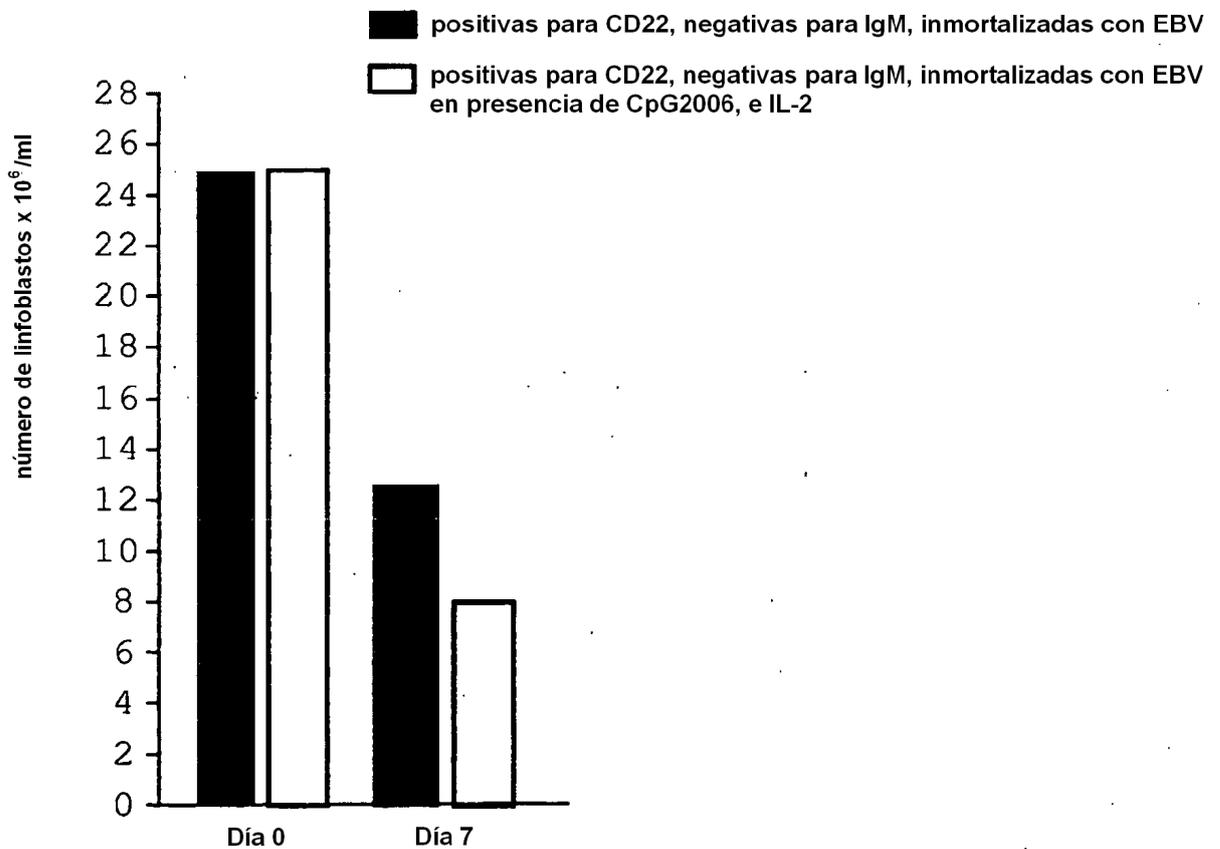
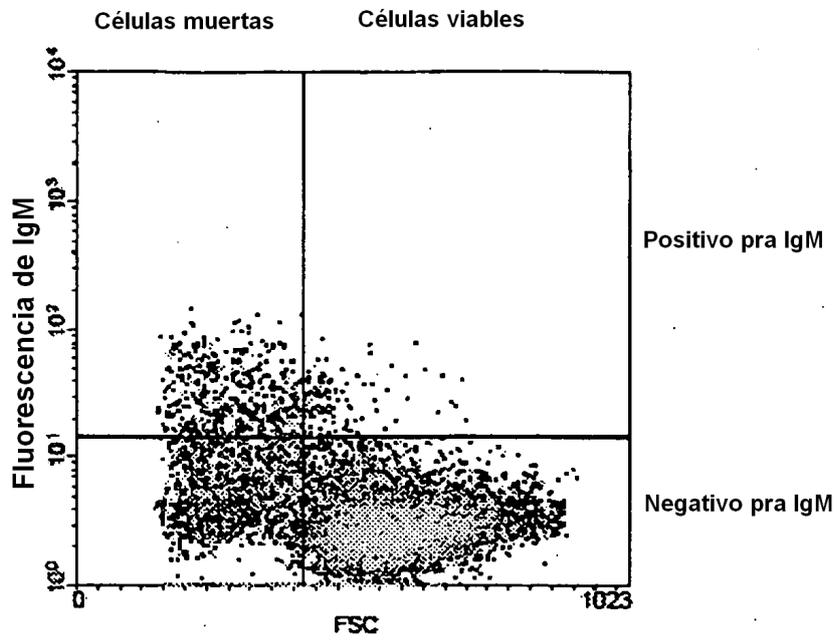


Fig. 7

A)



B)

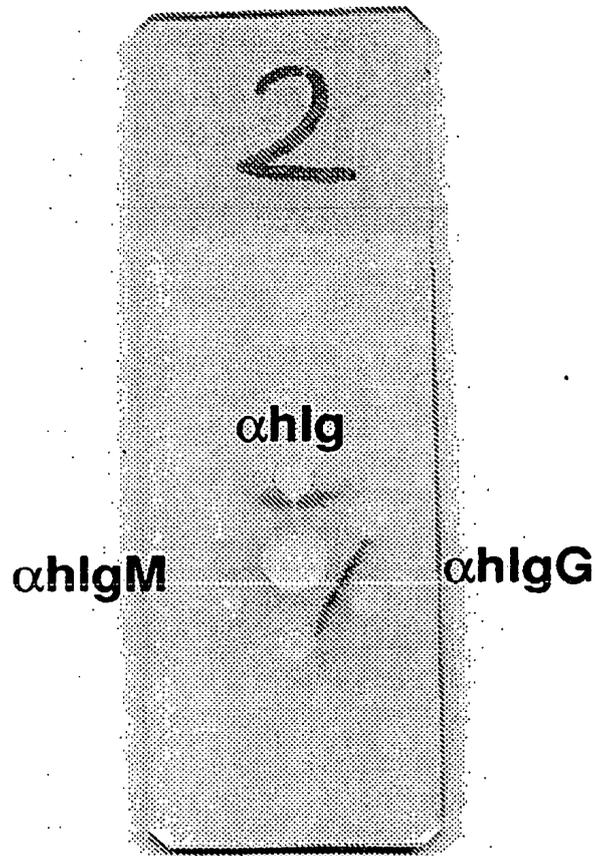
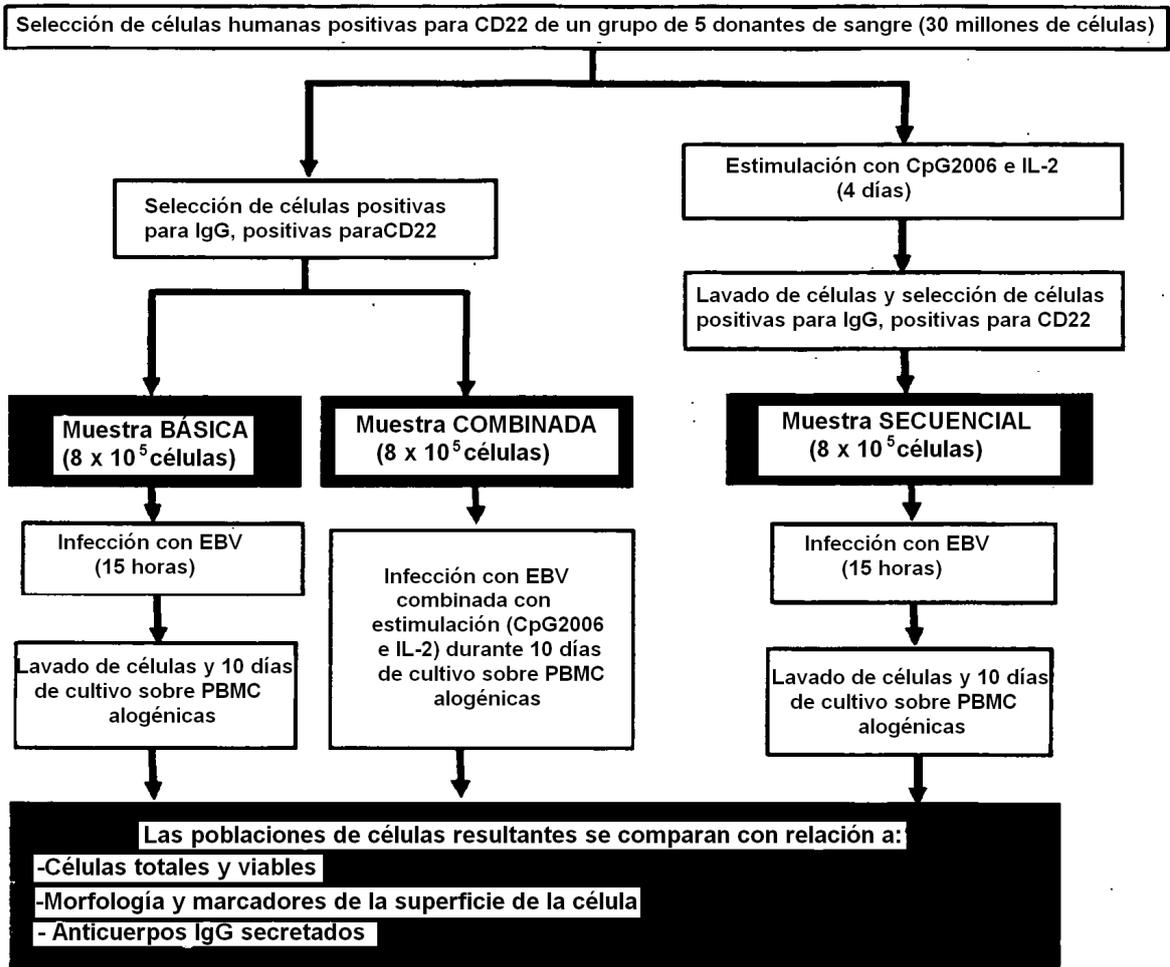


Fig. 8



B)

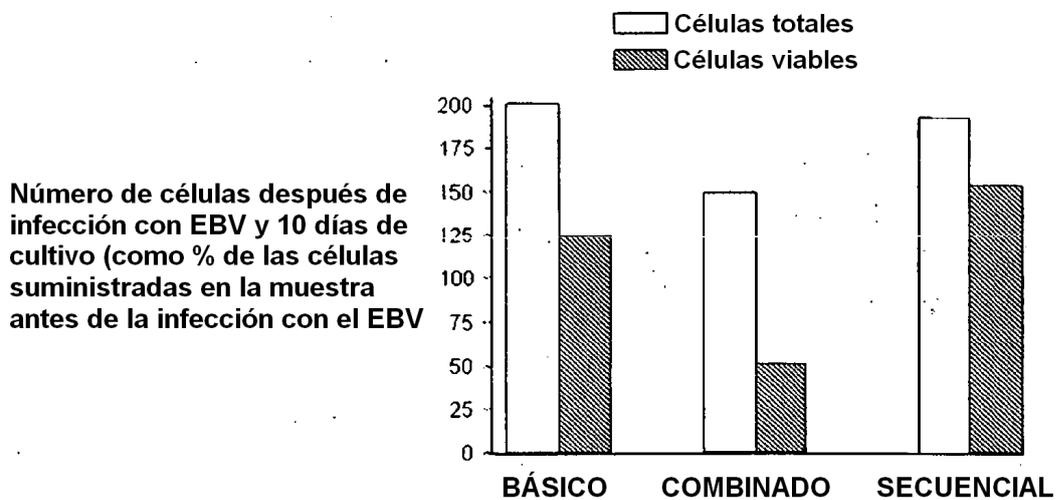


Fig. 9

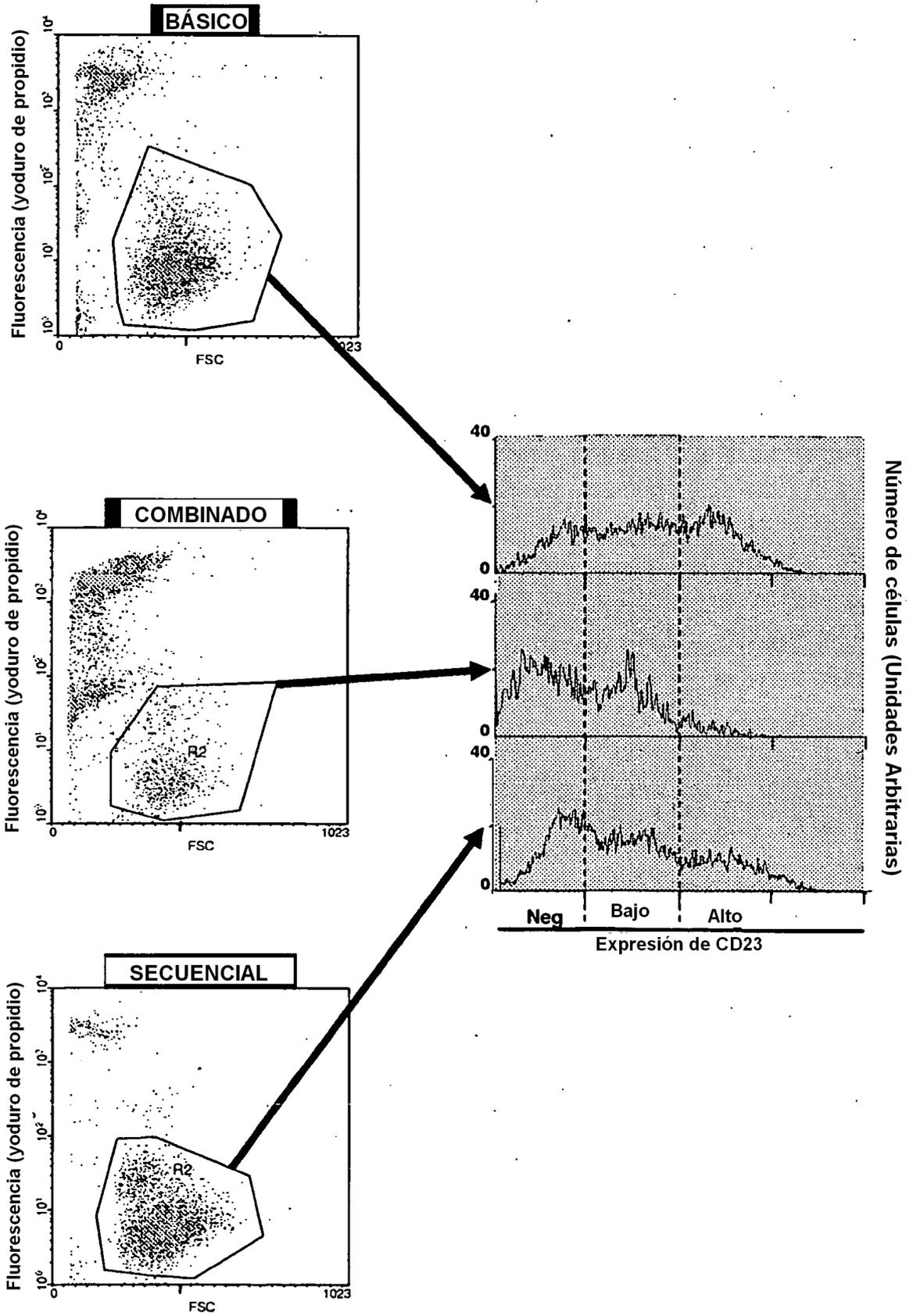


Fig. 10

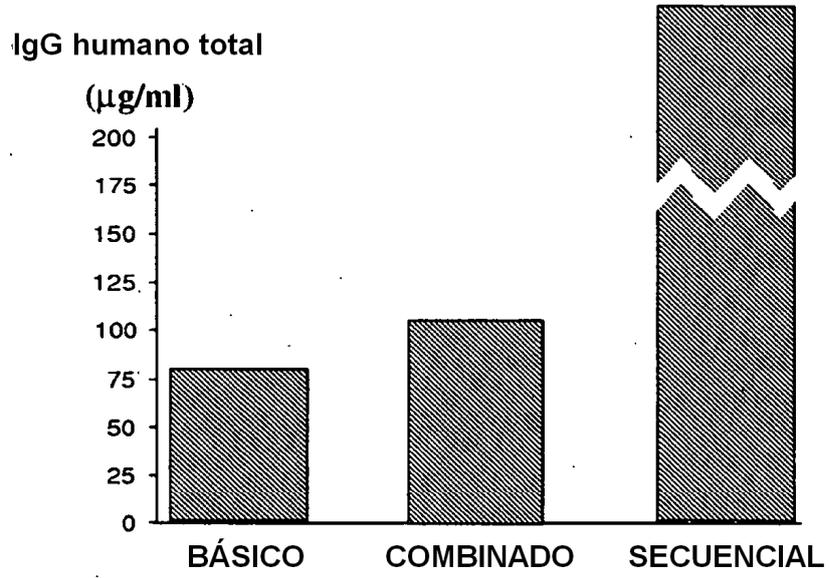


Fig. 11



Fig. 12

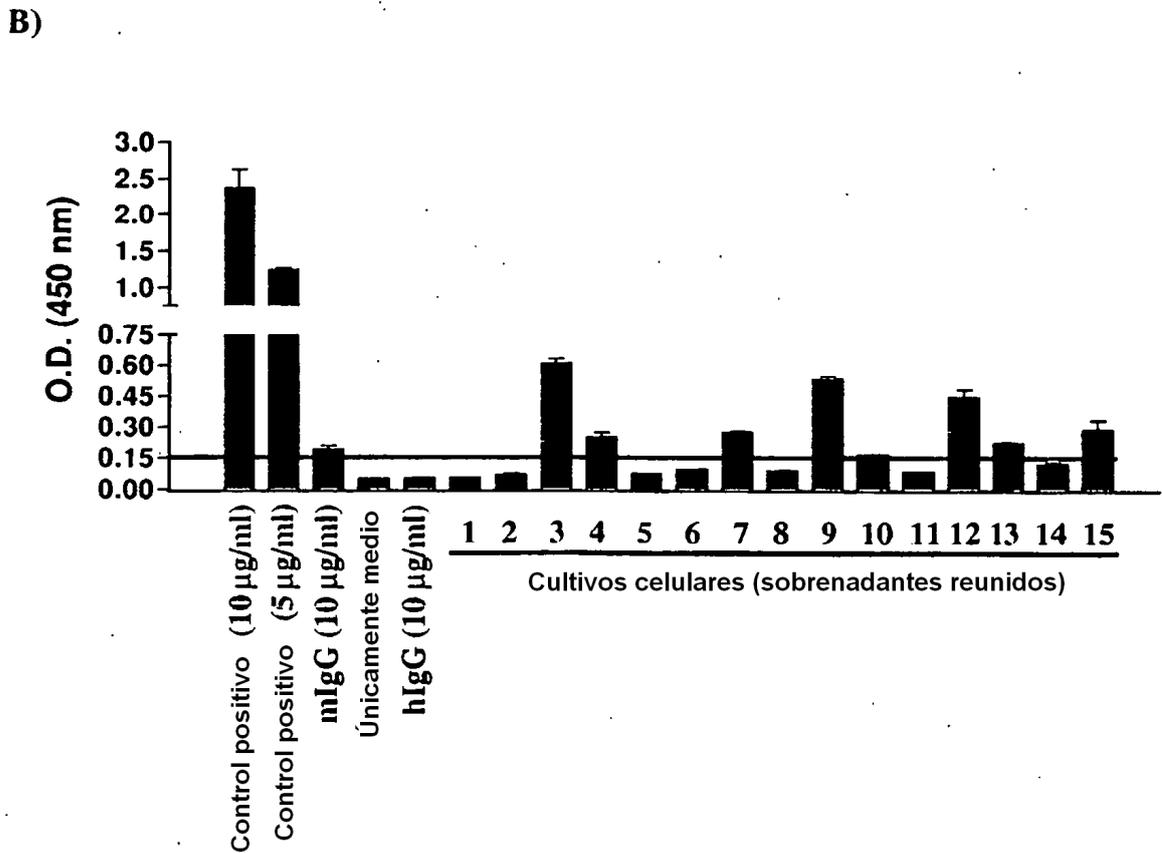
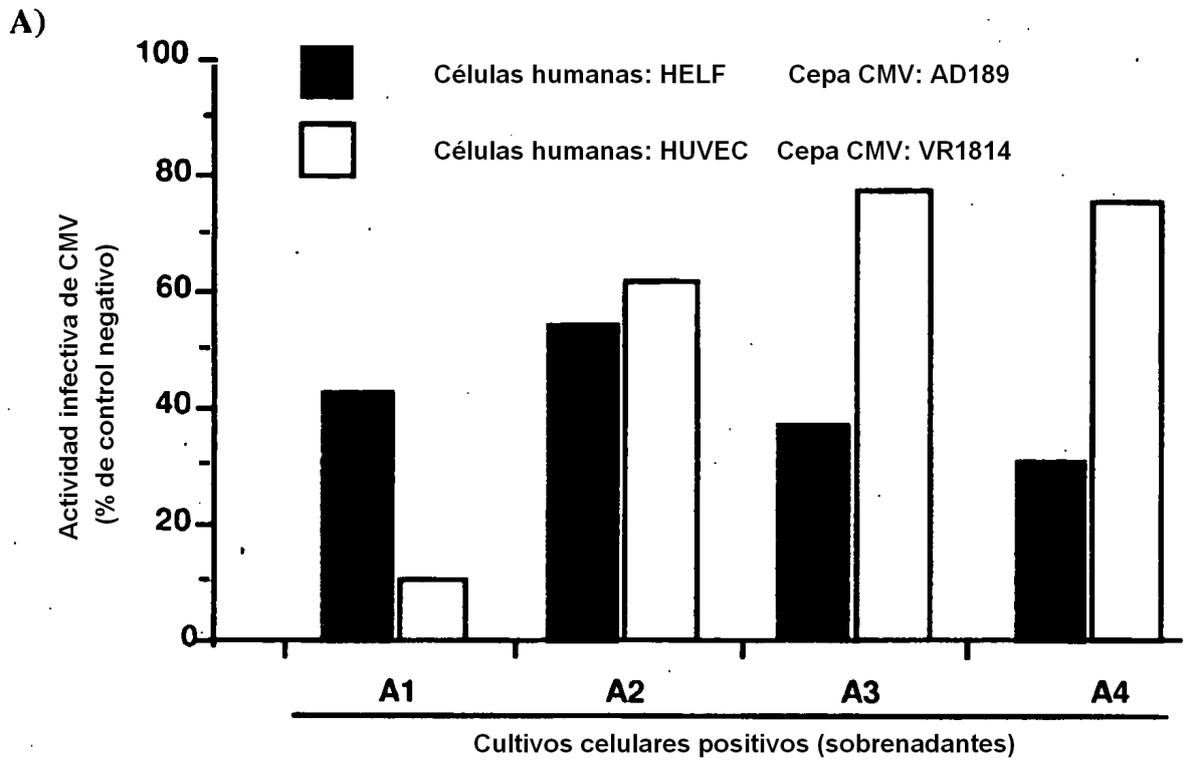


Fig. 13

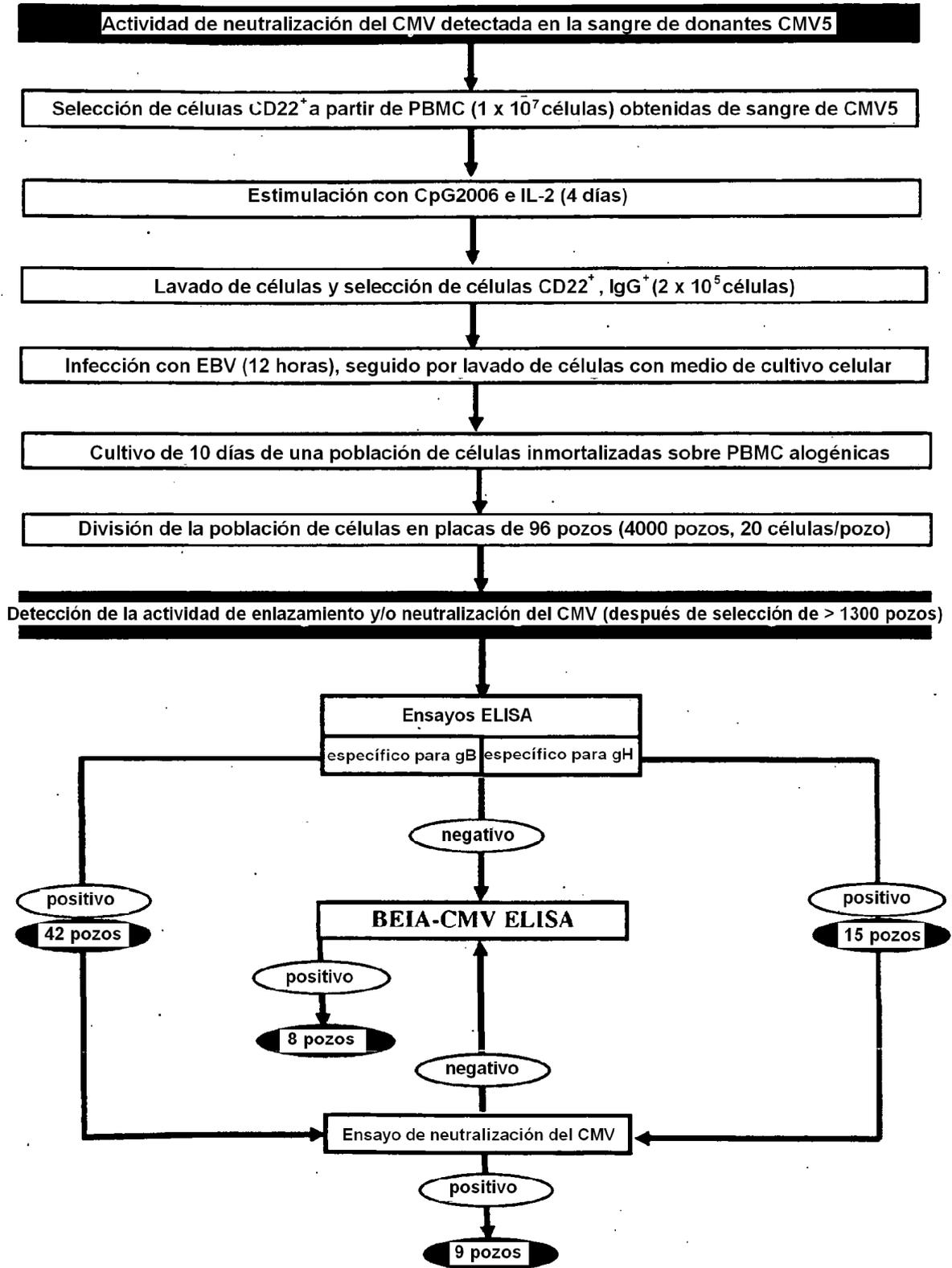


Fig. 14

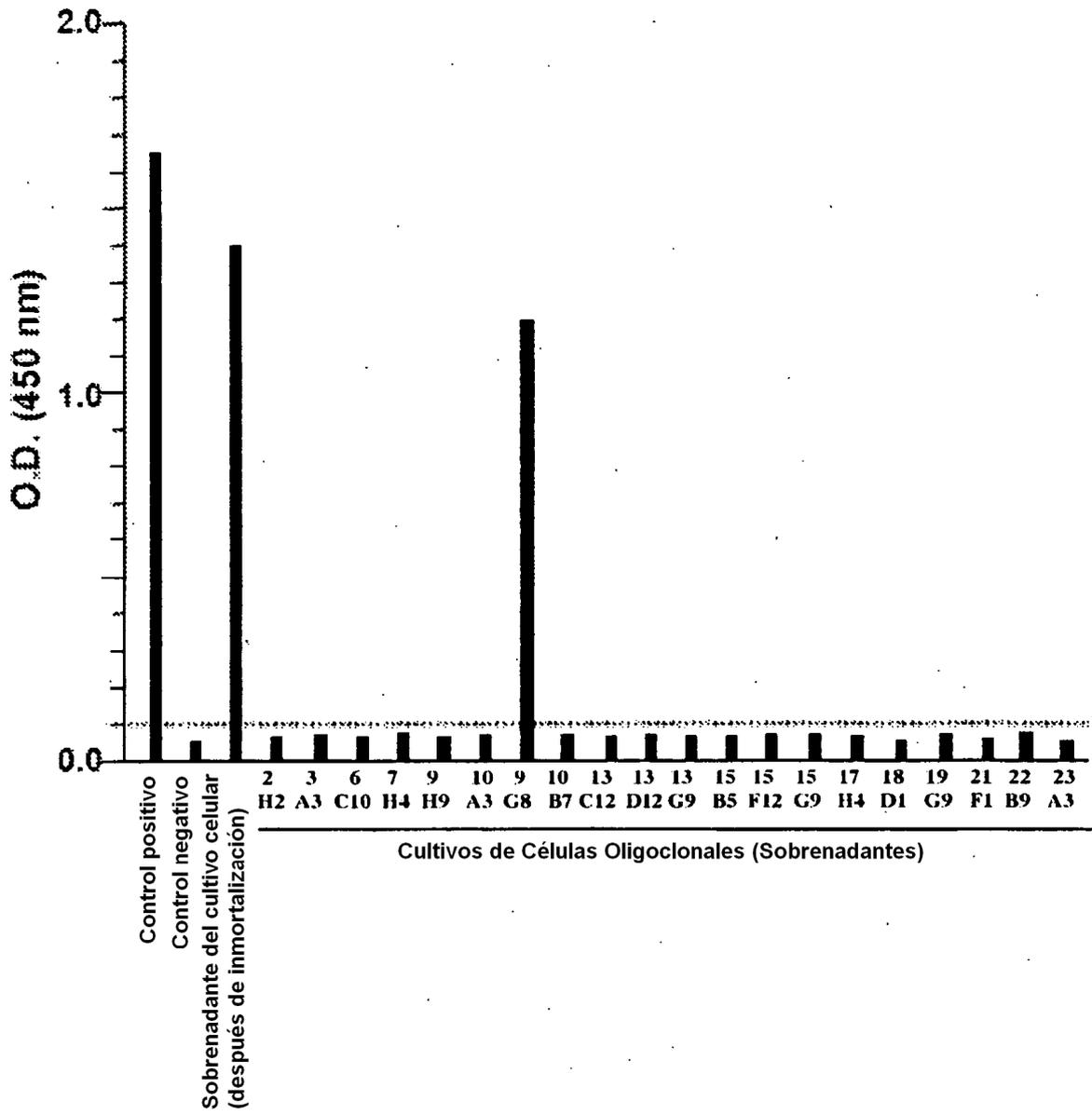


Fig. 15

A)

```

          10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HC 9G8  MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYTFDSYWIGWVRQMP
                                     HCDR1
          70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HC 9G8  GKGLEWMGIIYPGDSDIRYSPSFOGQVTISADKSISTASLQWSSLRASDTAMYCARHTY
                                     HCDR2
          130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HC 9G8  PGPNSGYDYFEYWGQGTILVTVSSASTKGPVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
                                     HCDR3
    
```

B)

```

          10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VL 9G8  FLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERVTLSCRASQSVYNLAWYQQKPGQAPRLLI
                                     LCDR1
          70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VL 9G8  YDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQLRRGTFGQGTKVEIKRTVA
                                     LCDR2                                     LCDR3
          130     140     150
.....|.....|.....|
VL 9G8  APSVFIFPPSDEQLKSGTASV
    
```

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4997764 A [0027] [0053]
- WO 9109115 A [0027] [0053] [0103] [0215]
- WO 04076677 A [0027] [0053] [0215]
- WO 8801642 A [0027]
- WO 9002795 A [0027]
- WO 9640252 A [0027]
- WO 0246233 A [0027] [0053]
- WO 0476677 A [0103]
- WO 9424164 A [0103] [0143]
- US 5798230 A [0125]
- WO 91091115 A [0143]
- WO 0582926 A [0159]
- WO 05003379 A [0159]
- WO 0583064 A [0159]
- WO 0576013 A [0159]
- WO 0149713 A [0170]
- EP 2005056871 W [0272]

10 Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- Human B-cell responses to cytokines. **Callard R ; Kotowicz K.** Cytokine Cell Biology: A practical Approach. Oxford University Press, 2000, 17 - 31 [0091] [0099]
- **Boehme K ; Compton T.** Cytomegaloviruses. Molecular Biology and Immunology. Norfolk: Caister Academic Press, 2006, 111 - 130 [0255]
- **Mach M.** CYTMEGALOVIRUSES. MOLECULAR BIOLOGY AND IMMUNOLOGY. 265 - 283 [0255]
- **Abel K et al.** Clin Diagn Lab Immunol., 2005, vol. 12, 606 - 21 [0271]
- **Akira S; Takeda K.** Nat Rev Immunol., 2004, vol. 4, 499 - 511 [0271]
- **Aldrich T. L. et al.** Biotechnol Prog., 2003, vol. 19, 1433 - 8 [0271]
- **Ambach A et al.** Mol Immunol., 2004, vol. 40, 1307 - 14 [0271]
- **Azim T; Crawford D.** Int J Cancer., 1988, vol. 42, 23 - 8 [0271]
- **Banchereau J ; Rousset, F.** Adv Immunol., 1992, vol. 52, 125 - 262 [0271]
- **Bason C et al.** Lancet., 2003, vol. 362, 1971 - 7 [0271]
- **Bass H ; Darke C.** Cell Prolif., 2004, vol. 37, 443 - 4 [0271]
- **Bernasconi N et al.** Science, 2002, vol. 298, 2199 - 2202 [0271]
- **Bernasconi N et al.** Blood, 2003, vol. 101, 4500 - 4504 [0271]
- **Bianchi A ; McGrew J.** Biotechnol Bioeng., 2003, vol. 84, 439 - 44 [0271]
- **Bishop G. A.; Busch LK.** Microbes Infect., 2002, vol. 4, 853 - 7 [0271]
- **Bohm E et al.** Biotechnol Bioeng., 2004, vol. 88, 699 - 706 [0271]
- **Bonaros NE et al.** Transplantation, 2004, vol. 77, 890 - 7 [0271]
- **Borrebaeck C et al.** PNAS, 1988, vol. 85, 3995 - 9 [0271]
- **Borrebaeck C.** J Immunol Meth, 1989, vol. 123, 157 - 165 [0271]
- **Borst J et al.** Curr Opin Immunol., 2005, vol. 17, 275 - 81 [0271]
- **Borth N.** Biotechnol Bioeng, 2002, vol. 77, 118 [0271]
- **Boyd A ; Fecondo J.** Immunol Cell Biol., 2003, vol. 66, 159 - 165 [0271]
- **Bourke E et al.** Blood, 2003, vol. 102, 956 - 63 [0271]
- **Bradbury A. et al.** Trends Biotechnol., 2003, vol. 21, 275-81312-7 [0271]
- **Bron D et al.** PNAS, 1984, vol. 81, 3214 - 7 [0271]
- **Butel J.** Carcinogenesis, 2000, vol. 21, 405 - 26 [0271]
- **Butler M.** Appl Microbiol Biotechnol., 2005, vol. 68, 283 - 91 [0271]
- **Carsetti R.** Methods Mol Biol., 2004, vol. 271, 25 - 35 [0271]
- **Carter P.** Nat Rev Immunol., 2006, vol. 6, 343 - 57 [0271]
- **Casali P et al.** Science, 1986, vol. 234, 476 - 9 [0271]
- **Chambers R.** Curr Opin Chem Biol., 2005, vol. 9, 46 - 50 [0271]
- **Chan M et al.** J Immunol, 1986, vol. 136, 106 - 112 [0271]
- **Chapman AP et al.** Nat Biotechnol., 1999, vol. 17, 780 - 3 [0271]
- **Chardes T et al.** FEBS Lett., 1999, vol. 452, 386 - 94 [0271]
- **Chatenoud L.** Methods Mol Med., 2005, vol. 109, 297 - 328 [0271]
- **Chen C et al.** J Surg Res., 2001, vol. 100, 166 - 70 [0271]
- **Chen K et al.** Biotechnol Bioeng., 2001, vol. 72, 55 - 61 [0271]
- **Coban C et al.** J Exp Med., 2005, vol. 201, 19 - 25 [0271]
- **Cognasse F. et al.** Clin Chem Lab Med., 2005, vol. 43, 22 - 31 [0271]
- **Cole S.** Mol Cell Bioch, 1984, vol. 62, 109 - 120 [0271]
- **Craxton A et al.** Blood, 2003, vol. 101, 4464 - 71 [0271]
- **Crotty S; Ahmed R.** Semin Immunol., 2004, vol. 16, 197 - 203 [0271]
- **Crotty S et al.** J Immunol Meth, 2004, vol. 286, 111 - 122 [0271]

- **Damania B.** *Nat Rev Microbiol.*, 2004, vol. 2, 656 - 68 [0271]
- **Danczyk R et al.** *Biotechnol Bioeng.*, 2003, vol. 20 (84), 215 - 23 [0271]
- **Dattamajumdar AK et al.** *Immunogenetics*, 1996, vol. 43, 141 - 51 [0271]
- 5 • **Davenport C et al.** *FEMS Microbiol Immunol.*, 1992, vol. 4, 335 - 43 [0271]
- **Dessain SK et al.** *J Immunol Methods.*, 2004, vol. 291, 109 - 22 [0271]
- **Dinnis D ; James D.** *Biotechnol Bioeng.*, 2005, vol. 91, 180 - 9 [0271]
- **Dunman PM ; Nesin M.** *Curr Opin Pharmacol.*, 2003, vol. 3, 486 - 96 [0271]
- **Eaton-Bassiri A et al.** *Infect Immun.*, 2004, vol. 72, 7202 - 11 [0271]
- 10 • **Essono S et al.** *J Immunol Methods.*, 2003, vol. 279, 251 - 66 [0271]
- **Evans L et al.** *J Immunol*, 1988, vol. 140, 941 - 943 [0271]
- **Fang J et al.** *Nat Biotechnol.*, 2005, vol. 23, 584 - 90 [0271]
- **Fearon D ; Carroll M.** *Ann Rev Immunol.*, 2000, vol. 18, 393 - 422 [0271]
- **Fearon K et al.** *Eur J Immunol*, 2003, vol. 33, 2114 - 2122 [0271]
- **Forthal D. N. et al.** *Transpl Infect Dis.*, 2001, vol. 3 (2), 31 - 4 [0271]
- 15 • **Furebring C et al.** *Mol Immunol.*, 2002, vol. 38, 833 - 40 [0271]
- **Gay, N. J. et al.** *Nat Rev Immunol.*, 2006, vol. 9, 693 - 698 [0271]
- **Gilliland L. K. et al.** *Tissue Antigens.*, 1996, vol. 47, 1 - 20 [0271]
- **Giudicelli, V. et al.** *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32, W435 - 440 [0271]
- **Goodrum F. D. et al.** *PNAS*, 2002, vol. 99, 16255 - 60 [0271]
- 20 • **Gosselin J et al.** *J Immunol.*, 2005, vol. 174, 1587 - 93 [0271]
- **Greijer A et al.** *J Clin Microbiol.*, 1999, vol. 37, 179 - 88 [0271]
- **Grunberg J et al.** *Biotechniques*, 2003, vol. 34, 968 - 72 [0271]
- **Gursel I et al.** *J Immunol.*, 2001, vol. 167, 3324 - 8 [0271]
- **Gursel M et al.** *J Leukoc Biol.*, 2002, vol. 71, 813 - 20 [0271]
- 25 • **Haan K et al.** *J Virol.*, 2001, vol. 75, 3016 - 20 [0271]
- **Haab B. B.** *Mol Cell Proteomics.*, 2005, vol. 4, 377 - 83 [0271]
- **Hale G et al.** *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 2004, vol. 48, 258 - 66 [0271]
- **Hartmann G et al.** *J Immunol*, 2002, vol. 164, 1617 - 1624 [0271]
- **Hartmann G ; Krieg A.** *J Immunol.*, 2000, vol. 164, 944 - 53 [0271]
- 30 • **Hayashi E et al.** *J Immunol.*, 2005, vol. 174 (11), 6639 - 47 [0271]
- **He B et al.** *J Immunol.*, 2004, vol. 172, 3268 - 79 [0271]
- **Heinrichs A et al.** *J Immunol Methods.*, 1995, vol. 178, 241 - 51 [0271]
- **Hemmi H et al.** *Nature*, 2000, vol. 408, 740 - 5 [0271]
- **Henault M et al.** *J Immunol Methods.*, 2005, vol. 300, 93 - 9 [0271]
- 35 • **Hoet R et al.** *Nat Biotechnol*, 2005, vol. 23, 344 - 348 [0271]
- **Horenstein AL et al.** *J Immunol Methods*, 2003, vol. 275, 99 - 112 [0271]
- **Humme S.** *PNAS*, 2003, vol. 100, 10989 - 94 [0271]
- **Hur D et al.** *Cell Prolif.*, 2005, vol. 38, 35 - 45 [0271]
- **Huse K et al.** *J Biochem Biophys Methods*, 2002, vol. 51, 217 - 31 [0271]
- 40 • **Hwang W ; Foote J.** *Methods*, 2005, vol. 36, 3 - 10 [0271]
- **Ifversen P et al.** *Hum Antibodies Hybridomas.*, 1993, vol. 4, 113 - 123 [0271]
- **Imadome K et al.** *PNAS.*, 2003, vol. 100, 7836 - 40 [0271]
- **James K ; Bell G.** *J Immunol Methods.*, 1987, vol. 100, 5 - 40 [0271]
- **Jarrin A ; Andrieux A.** *Methods Mol Biol.*, 1999, vol. 96, 21 - 8 [0271]
- 45 • **Jensen L. B. et al.** *J Immunol Methods.*, 2004, vol. 284, 45 - 54 [0271]
- **Jondal M ; Klein G.** *J Exp Med*, 1973, vol. 138, 1365 - 1378 [0271]
- **Jovelin F et al.** *Biotechniques.*, 1995, vol. 1.9, 378 - 82 [0271]
- **Jung J et al.** *J Immunol*, 2002, vol. 169, 2368 - 2373 [0271]
- **Kandimalla ER et al.** *PNAS.*, 2005, vol. 102, 6925 - 30 [0271]
- 50 • **Keller M. A. ; Stiehm ER.** *Clin Microbiol Rev.*, 2000, vol. 13, 602 - 14 [0271]
- **Kellermann S ; Green L.** *Curr Opin Biotechnol.*, 2002, vol. 13, 593 - 7 [0271]
- **Kern F et al.** *Trends Immunol.*, 2005, vol. 26, 477 - 84 [0271]
- **Kilger E et al.** *EMBO J.*, 1998, vol. 17, 1700 - 9 [0271]
- **Kim S. J. et al.** *Mol Cells.*, 2005, vol. 20, 17 - 29 [0271]
- 55 • **Klinman D et al.** *PNAS*, 1996, vol. 93, 2879 - 2883 [0271]
- **Klinman D.** *Nat Rev Immunol.*, 2004, vol. 4, 249 - 58 [0271]
- **Kocher A. A. et al.** *J Heart Lung Transpl.*, 2003, vol. 22, 250 - 7 [0271]
- **Kohler G ; Milstein C.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 - 497 [0271]
- **Konishi K.** *J Gen Virol.*, 2001, vol. 82, 1451 - 6 [0271]
- 60 • **Kretzmer G.** *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2002, vol. 59, 135 - 42 [0271]
- **Krieg A et al.** *Nature*, 1995, vol. 374, 546 - 9 [0271]
- **Krieg A.** *Annu Rev Immunol.*, 2002, vol. 20, 709 - 60 [0271]
- **Kruger R. M. et al.** *J Heart Lung Transpl.*, 2003, vol. 22, 754 - 63 [0271]
- **Laffy E; Sodoyer R.** *Hum. Antibodies.*, 2005, vol. 14, 33 - 55 [0271]
- 65 • **Lal SP et al.** *Drug Discov Today.*, 2002, vol. 7, 143 - 9 [0271]

- Landolfo S et al. *Pharmacol Ther.*, 2003, vol. 98, 269 - 97 [0271]
- Laquerre S et al. *J Virol.*, 1998, vol. 72, 6119 - 30 [0271]
- Laroche-Traineau J et al. *Hum Antib Hydrid.*, 1994, vol. 5, 165 - 177 [0271]
- 5 • Li H et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, vol. 207, 985 - 93 [0271]
- Li J et al. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2006, vol. 103, 3557 - 62 [0271]
- Lightwood D et al. *J Immunol Methods.*, 2006, vol. 316, 133 - 43 [0271]
- Ling N. *J Immunol Methods.*, 2000, vol. 238, 3 - 15 [0271]
- Lobo E et al. *J Pharm Sci.*, 2004, vol. 93, 2645 - 68 [0271]
- 10 • Ma J. K. et al. *Vaccine.*, 2005, vol. 23, 1814 - 8 [0271]
- Mancini G et al. *Immunochemistry.*, 1965, vol. 2, 235 - 254 [0271]
- Mancini N et al. *New Microbiol.*, 2004, vol. 27, 315 - 28 [0271]
- McHeyzer-Williams L ; McHeyzer-Williams M. *Annu Rev Immunol.*, 2005, vol. 23, 487 - 513 [0271]
- Mezzasoma L et al. *Clin Chem.*, 2002, vol. 48, 121 - 30 [0271]
- 15 • Morgenthaler N et al. *J. Clin Endocrinology.*, 1996, vol. 81, 3155 - 3161 [0271]
- Mulder A et al. *Hum Immunol.*, 1993, vol. 36, 186 - 92 [0271]
- Murray A et al. *J Chromatogr Sci.*, 2002, vol. 40, 343 - 9 [0271]
- Nemerow G et al. *J Virol*, 1985, vol. 55, 347 - 351 [0271]
- Nicholas J. *Mol Pathol.*, 2000, vol. 53, 222 - 37 [0271]
- 20 • Niedbala W ; Kurpisz M. *Immunol Lett.*, 1993, vol. 35, 93 - 100 [0271]
- Niedbala W ; Stott D. *Hybridoma*, 1998, vol. 17, 299 - 304 [0271]
- Nisnevitch M ; Firer M. A. *J Biochem Biophys Methods.*, 2001, vol. 49, 467 - 80 [0271]
- Nitschke L. *Curr Opin Immunol.*, 2005, vol. 17, 290 - 7 [0271]
- Norderhaug L et al. *J Immunol Methods.*, 1997, vol. 204, 77 - 87 [0271]
- 25 • Oh H et al. *Cell Prolif.*, 2003, vol. 36, 191 - 97 [0271]
- Ohlin M et al. *J Virol.*, 1993, vol. 67, 703 - 10 [0271]
- Olivo P. *Clin Microbiol Rev.*, 1996, vol. 9, 321 - 34 [0271]
- Olsson L ; Kaplan H. *PNAS*, 1980, vol. 77, 5429 - 5431 [0271]
- Park C. H. et al. *J Cell Biochem.*, 2004, vol. 91, 777 - 85 [0271]
- Pavlou A ; Belsey M. *Eur J Pharm Biopharm.*, 2005, vol. 59, 389 - 96 [0271]
- 30 • Peng S. *Curr Opin Immunol.*, 2005, vol. 17, 230 - 6 [0271]
- Posner M et al. *J Immunol.*, 1991, vol. 146, 4325 - 4332 [0271]
- Potera C. *Genetic Eng News.*, 2005, vol. 25, 10, http://www.trellisbio.com/article_GEN_051505.pdf [0271]
- Poul M. A. et al. *Immunotechnology.*, 1995, vol. 1, 189 - 96 [0271]
- Radons J et al. *J Immunol Methods.*, 2005, vol. 303, 135 - 41 [0271]
- 35 • Raff H et al. *J Exp Med.*, 1988, vol. 168, 905 - 17 [0271]
- Ranjan D et al. *Cell Biochem Funct.*, 2006, vol. 24, 147 - 152 [0271]
- Reinhardt B et al. *J Virol Methods.*, 2003, vol. 109, 1 - 9 [0271]
- Rickinson A. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2001, vol. 356, 595 - 604 [0271]
- 40 • Roque A. C. et al. *Biotechnol Prog.*, 2004, vol. 20, 639 - 5 [0271]
- Schlatter S et al. *Biotechnol Prog.*, 2005, vol. 21, 122 - 33 [0271]
- Schlee M et al. *J Virol.*, 2004, vol. 78, 3941 - 52 [0271]
- Schmidt F. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2004, vol. 65, 363 - 72 [0271]
- Schneider P. *Curr Opin Immunol.*, 2005, vol. 17, 282 - 9 [0271]
- 45 • Schoppel K et al. *Virology.*, 1996, vol. 216, 133 - 45 [0271]
- Sen G et al. *Cell Immunol.*, 2004, vol. 232, 64 - 74 [0271]
- Sorensen H ; Mortensen K. *J Biotech.*, 2005, vol. 115, 113 - 28 [0271]
- Speck P et al. *J Gen Virol.*, 1999, vol. 80, 2193 - 203 [0271]
- Steenbakkens P et al. *Hum Antibod Hybrid.*, 1993, vol. 4, 166 - 173 [0271]
- 50 • Steenbakkens P et al. *Mol Biol Rep.*, 1994, vol. 19, 125 - 134 [0271]
- Sugimoto M et al. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, 3361 - 4 [0271]
- Sun L et al. *J Immunol. Methods.*, 2003, vol. 282, 45 - 52 [0271]
- Takeshita F et al. *J Immunol.*, 2001, vol. 167, 3555 - 8 [0271]
- Tangye S et al. *J Immunol.*, 2003, vol. 170, 261 - 9 [0271]
- 55 • Tanner J. E. ; Menezes J. *Blood.*, 1994, vol. 84, 3956 - 64 [0271]
- Thomas T. M. et al. *Hybrid Hybridomics.*, 2003, vol. 22, 47 - 53 [0271]
- Thomsen M et al. *Tissue Antigens.*, 2005, vol. 66, 73 - 82 [0271]
- Thorley-Lawson D. A. *Nat Rev Immunol.*, 2001, vol. 1 (1), 75 - 82 [0271]
- Torres M et al. *J Immunol.*, 2005, vol. 174, 2132 - 42 [0271]
- Traggiai E et al. *Nat Med*, 2004, vol. 10, 871 - 875 [0271]
- 60 • Tsuchiyama L et al. *Hum Antibodies.*, 1997, vol. 8, 43 - 7 [0271]
- Ulevitch R. *Nat Rev Immun.*, 2004, vol. 4, 512 - 520 [0271]
- Venturi M et al. *J Mol Biol*, 2002, vol. 315, 1 - 8 [0271]
- Verdoliva A et al. *J Immunol Methods.*, 2002, vol. 271, 77 - 8 [0271]
- Viau M ; Zouali M. *Clin Immunol.*, 2005, vol. 114, 17 - 26 [0271]
- 65 • Wallis R et al. *J Clin Invest*, 1989, vol. 84, 214 - 219 [0271]

- **Wen et al.** Eur J Immunol., 1987, vol. 17, 887 - 92 [0271]
 - **Wendel-Hansen V et al.** Leukemia., 1994, vol. 8, 476 - 84 [0271]
 - **Wroblewski J et al.** J Immunol Meth., 2002, vol. 264, 19 - 28 [0271]
 - **Yamaguchi H et al.** PNAS, 1987, vol. 84, 2416 - 2420 [0271]
- 5 • **Yoon SK et al.** Biotechnol Prog., 2004, vol. 20, 1683 - 8 [0271]