

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 960**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02788154 .9**  
96 Fecha de presentación: **18.12.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1458855**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Procedimiento para la generación de líneas celulares proliferativas y que se diferencian**

30 Prioridad:  
**18.12.2001 GB 0130223**  
**14.03.2002 GB 0206086**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2012**

73 Titular/es:  
**Cancer Research Technology Limited**  
**Angel Building 407 St. John Street**  
**London EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:  
**SPITS, Hergen;**  
**NASPETTI, M.;**  
**SCHEEREN, Ferenc y**  
**BLOM, Bianca**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 384 960 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la generación de líneas celulares proliferativas y que se diferencian.

**[0001]** El campo de la presente invención es la producción y mantenimiento de líneas celulares, en especial líneas celulares a partir de células primarias, es decir, células no transformadas. En particular, pero no exclusivamente, la presente invención se refiere a materiales y procedimientos relacionados con la producción y mantenimiento de linfocitos B humanos productores de anticuerpos.

**[0002]** Los anticuerpos monoclonales (mAb) son herramientas poderosas con utilidad demostrada en todos los campos de la investigación biomédica. La amplia mayoría de anticuerpos monoclonales producidos hasta hace poco han sido de origen de ratón. Sin embargo, la aplicación de estos mAb para propósitos terapéuticos en el hombre está dificultada por el hecho de que los seres humanos desarrollan rápidamente anticuerpos dirigidos contra Ig de ratón cuando se tratan con mAb de origen de ratón. Estas respuestas inmunitarias contra mAb de ratón disminuyen mucho su eficacia terapéutica. Por lo tanto, no es sorprendente que se hayan hecho muchos esfuerzos para desarrollar procedimientos que permiten la producción de anticuerpos monoclonales humanos para propósitos terapéuticos. Una estrategia para lograr este objetivo ha sido remodelar genéticamente anticuerpos murinos cambiando segmentos de gen constantes del anticuerpo murino por sus equivalentes humanos (Jones y col., 1986; Morrison y col., 1984) o más recientemente crear ratones que llevan genes de Ig humana (Fishwild y col., 1996; Mendez y col., 1997). Otra es el uso de la presentación en fago para crear anticuerpos humanos (Hoogenboom y Chames, 2000; Winter y col., 1994). Aunque el valor de estas tecnologías es indiscutible, sería muy conveniente desarrollar una tecnología para aislar linfocitos B productores de anticuerpos de seres humanos con una especificidad deseada.

**[0003]** Específicamente, el aislamiento de linfocitos B productores de anticuerpos de seres humanos que resolviera una exposición a patógenos con una eficacia alta o excepcional, ofrecería un medio para el aislamiento directo de mAb con eficacia probada en el marco clínico. Las estrategias basadas en hibridoma para lograr este objetivo se han visto obstaculizadas por los problemas de lograr fusiones estables de linfocitos B con líneas celulares de mieloma humano o de ratón, aunque recientemente se ha descrito una nueva línea celular de mieloma humano, que parece que es adecuada para la fusión estable con linfocitos B humanos (Karpas y col., 2001). Como procedimiento alternativo se han inmortalizado linfocitos B productores de anticuerpos con el virus de Epstein Barr (EBV). Sin embargo, estos intentos han tenido un éxito limitado. Aunque se ha establecido que los clones de EBV-LCL producen anticuerpos, las valoraciones son bajas y con frecuencia estas líneas no son estables (Roder y col., 1986). Además, el EBV no transforma con preferencia células que producen anticuerpos.

**[0004]** Los linfocitos B humanos se pueden cultivar durante un periodo de tiempo limitado con CD40L y bien IL-4 sola o una combinación de IL-2 e IL-4 (Banchereau y col., 1991). La IL-10 puede inducir más crecimiento de los linfocitos B cultivados y la diferenciación en linfocitos B altos productores de anticuerpos (Malisan y col., 1996). Estos linfocitos B cultivados tienen una duración de vida replicativa limitada y después de 6 semanas, la mayoría de los linfocitos B han sufrido apoptosis, impidiendo la generación de líneas de linfocitos B humanos productores de anticuerpos.

**[0005]** Por lo tanto, en resumen, a pesar de los considerables esfuerzos, la generación de anticuerpos monoclonales humanos por fusión de estas células con células de mieloma humano o de ratón, ha sido muy difícil. Los intentos de generar valoraciones altas de linfocitos B transformados por EBV productores de anticuerpos también ha encontrado problemas considerables.

**[0006]** Los autores de la invención han ideado un procedimiento para establecer cultivos de larga duración de células de interés específico, en particular linfocitos B humanos productores de anticuerpos. Este procedimiento explota la capacidad de un mutante activo del transductor de señales de activación y transcripción (STAT), en particular STAT5 (5b o 5a), de conferir una duración de la vida replicativa prolongada.

**[0007]** STAT5b es activada por la IL-2 y probablemente tiene una función en el progreso del ciclo celular inducido por la IL-2 (Moriggl y col., 1999). Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que la introducción de mutantes activos constitutivos (CA) de STAT5a o STAT5b (CA-STAT5a y CA-STAT5b respectivamente) en linfocitos B humanos permite el establecimiento de cultivos de larga duración de linfocitos B humanos. Los autores de la invención han encontrado que CA-STAT5b es particularmente eficaz en el establecimiento de cultivos de linfocitos B humanos de larga duración. Además, los autores de la invención han determinado que la expresión de BCL-6, que inhibe la diferenciación de los linfocitos de B de memoria en células plasmáticas (Reljic, 2000), es regulada por STAT5b. Después de la introducción de un híbrido de CA-STAT5b con un receptor de estrógenos mutado, se obtienen líneas de linfocitos B de larga duración que proliferan en respuesta a CD40L, IL-2 e IL-4 de una forma dependiente del 4-hidroxitamoxifeno. Los autores de la invención demuestran además que los transcritos de BCL-6 son regulados por aumento por STAT5b-ER de una forma dependiente del hidroxitamoxifeno, en presencia de la ciclohexamida inhibidora de la síntesis de proteínas, indicando que BCL-6 es

un objetivo directo de STAT5b. Por lo tanto, los datos ponen de manifiesto una nueva función de STAT5 en el control de la diferenciación de linfocitos B maduros.

**[0008]** Recientemente se ha mostrado que la introducción de BCL-6, que inhibe la diferenciación de linfocitos B de memoria en células plasmáticas (Reljic, 2000), en linfocitos B de amígdala humana produce una prolongación considerable de la duración de la vida replicativa de estas células (Shvarts, 2002). BCL-6 codifica un represor de la transcripción, que es activado con frecuencia por translocaciones cromosómicas en el linfoma de no Hodgkin (Ye, 1993; Chang, 1996; Staudt, 1999; Shaffer, 2000). Las translocaciones cromosómicas que implican a BCL-6 afectan invariablemente solo al promotor y dejan el marco de lectura abierto de BCL-6 intacto. Por lo tanto, las translocaciones de BCL-6 en el linfoma de no Hodgkin contribuyen a la oncogénesis por desregulación de la expresión de la proteína BCL-6 natural. BCL-6 es necesaria para el desarrollo normal de linfocitos B y T (Ye, 1997). Se cree que BCL-6 funciona principalmente en la diferenciación de linfocitos y en la regulación de la respuesta inmunitaria. Esto se basa en la implicación de BCL-6 en el linfoma de no Hodgkin, el defecto en la formación del centro germinal de ratones que no expresan BCL-6 (Dent, 1997; Fukuda, 1997; Ye, 1997) y el descubrimiento de que BCL-6 regula una serie de genes implicados en la fisiología de los linfocitos (Ye, 1997; Shaffer, 2000). Recientemente Fearon y colaboradores demostraron que BCL-6 previene la diferenciación terminal del centro germinal y linfocitos B de memoria, previniendo de esta forma la detención del ciclo celular (Reljic, 2000; Fearon, 2001). Por lo tanto, el descubrimiento de que la expresión de BCL-6 en linfocitos B humanos cultivados produce una prolongación considerable de la duración de la vida de estas células (Shvarts, 2002) está de acuerdo con la idea de que la diferenciación terminal es responsable de la duración de la vida relativamente corta de los linfocitos B cultivados con CD40L y citoquinas. Dada la importante función de BCL-6 en la regulación de la diferenciación y crecimiento de linfocitos B, la cuestión de cómo es regulado este gen tiene un gran interés. El examen del promotor de BCL-6 puso de manifiesto la presencia de dos sitios de unión de STAT5 (Ohashi, 1995), dando la idea a los autores de la invención de que STAT5 puede regular la expresión de BCL-6.

**[0009]** En el presente documento se describen procedimientos de mantenimiento de una línea celular mediante prolongación de la duración de la vida replicativa de las células, hasta el momento en el que se requiera que la célula se diferencie, produciendo de esta forma un producto expresado deseado, p. ej., una proteína, enzima o anticuerpo.

**[0010]** En un primer aspecto, se proporciona un procedimiento in vitro para estabilizar una línea celular de linfocitos B maduros, que comprende las etapas de introducir una proteína STAT constitutivamente activa (CA-STAT) en un linfocito B maduro; y mantener dicha célula en un entorno en el que pueda replicarse; en el que dicha proteína STAT es STAT5, STAT5a o STAT5b.

**[0011]** Por conveniencia, el siguiente texto se centra en la situación en la que se usa la proteína/ácido nucleico STAT, en particular STAT5.

**[0012]** La célula preferiblemente es un linfocito B de mamífero, en particular linfocito B humano. La célula se mantiene preferiblemente en un entorno que comprende uno o más de los siguientes componentes, IL-2, CD40L e IL-4.

**[0013]** La proteína STAT5 se introduce preferiblemente en la célula por transducción. En otras palabras, se puede incorporar una construcción de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína STAT5 en el genoma de la célula en la que se puede expresar. La introducción, que también se puede denominar en general sin limitación como "transfección" o "transformación", puede usar cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción usando retrovirus, lentivirus u otros virus, p. ej., vaccinia, o para células de insecto, baculovirus. Como alternativa, se podría usar la inyección directa del ácido nucleico. En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico que codifica STAT5 se introduce en la célula en cuestión usando un vector retroviral.

**[0014]** Los genes marcadores tales como genes de sensibilidad o resistencia a antibióticos o genes que codifican marcadores tales como antígenos de superficie celular o proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde, se pueden usar para identificar los clones que contienen el ácido nucleico introducido, como se conoce en la materia.

**[0015]** Las razones para mantener un linfocito B, en particular, un linfocito B primario, en forma de una línea celular, a menudo es porque el tipo de célula particular es útil para la investigación, incluyendo los fines de investigación médica, o es una célula que puede expresar una proteína deseable particular, p. ej., una enzima, anticuerpo u hormona, que se podría producir convenientemente en mayores cantidades de los que se puede extraer en realidad de células aisladas.

**[0016]** La descripción de la presente invención se concentra en la generación de linfocitos B humanos productores de anticuerpos. La capacidad para producir líneas celulares de linfocitos B humanos productores de anticuerpos es muy importante, ya que estas células pueden conducir a la producción de anticuerpos extremadamente valiosos,

que no se pueden obtener de otras fuentes. Por ejemplo, es preferible que las células de acuerdo con el primer aspecto de la invención, se obtengan de un paciente que ha mostrado señales de producir anticuerpos protectores contra un patógeno o célula tumoral. La producción de una línea celular usando estas células permitirá el mantenimiento y la extracción directa o indirecta del anticuerpo protector en cantidades útiles, de modo que se pueda ensayar y potencialmente producir en una composición farmacéutica.

**[0017]** Los genes que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras de la Ig pueden ser expresados en las células y extraer el anticuerpo directamente, o los genes se pueden recuperar de las células y expresarlos en una segunda línea celular, tal como CHO, MKC, etc., para la producción de la proteína del anticuerpo. Preferiblemente, la segunda línea celular es una línea celular validada, en cuanto que se puede usar para producir sustancias para usar en seres humanos. En otras palabras, se prefiere comprobar la segunda línea celular para asegurar que no produce agentes patógenos, p. ej., virus, priones, etc.

**[0018]** En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa de detener la replicación de las células de la línea celular llevando a cabo de esta forma la diferenciación terminal de la célula, de modo que la proteína deseada, el producto de expresión, p. ej., puedan producirse y extraerse directamente, o indirectamente, p. ej., por clonación del gen relevante en una segunda línea celular y producir la proteína a partir de dicha segunda línea celular. Después, la proteína se puede purificar y usar en la producción de una composición farmacéutica.

**[0019]** Los autores de la presente invención han ideado un mecanismo por el cual la acción de STAT5 en las células se puede desconectar para así inducir la diferenciación terminal.

**[0020]** Esta etapa se puede lograr de forma conveniente mediante la asociación de un agente inactivante con la proteína STAT5 en la célula transformada. El agente inactivante después se puede conectar o desconectar dependiendo de la etapa de la célula en el desarrollo de la línea celular.

**[0021]** Por lo tanto, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento in vitro para producir una línea celular de linfocitos B maduros, que comprende células de interés, p. ej., linfocitos B humanos productores de anticuerpos; comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

(a) incorporar en un linfocito B maduro una proteína CA-STAT5 en asociación con un agente inactivante;

(b) dejar que dichas células se repliquen mediante desconexión de dicho agente inactivante, haciendo así la CA-STAT5 activa; y

(c) mantener dicha línea celular producida.

**[0022]** El procedimiento puede comprender además la etapa de

(d) obtener una célula de dicha línea celular

(e) inducir la diferenciación terminal de dichas células conectando dicho agente inactivante haciendo así la STAT5 inactiva; y

(f) extraer una proteína deseada expresada por la célula diferenciada terminalmente.

**[0023]** Se puede clonar una célula de la línea celular con el fin de producir un anticuerpo monoclonal de los linfocitos B. No es necesario clonar una célula si es necesaria una combinación de anticuerpos.

**[0024]** También se describen en el presente documento las etapas de

(h) extraer opcionalmente los genes de Ig y expresarlos en líneas celulares validadas;

(i) purificar dicha proteína extraída; y

(j) producir una composición farmacéutica que comprende dicha proteína o ácido nucleico que la codifica.

**[0025]** El agente inactivante puede ser un sistema promotor/de escisión inducible tal como el sistema de escisión cre-lox o FLP/FRT. Por lo tanto, la expresión de STAT se puede conectar o desconectar usando un promotor inducible, o su expresión puede depender de un sistema de escisión inducible, p. ej., cre-lox o FLP/FRT. Además, se puede usar el ácido nucleico de sentido contrario, p. ej., el ARN interferente (ARNi) de doble cadena o ADN que produce ARNi, para controlar la expresión de STAT.

**[0026]** En la situación anterior, la etapa (f) del procedimiento se puede lograr eliminando el inductor del promotor inducible; activando el sistema de escisión cre-lox o FLP/FRT; o introduciendo la cadena de sentido contrario o ARNi.

**[0027]** En una realización preferida, el agente inactivante es una proteína que se asocia con dicha proteína STAT5 como una proteína de fusión. De forma conveniente, el gen que codifica el agente inactivante se puede fusionar al gen de STAT5 y expresar en la célula para así producir la proteína de fusión. Después, el agente inactivante se puede desconectar por alteración del entorno de la proteína de fusión. Por ejemplo, los autores de la presente  
 5 invención han mostrado satisfactoriamente que el receptor de estrógenos y STAT5 se pueden producir en la célula deseada como una proteína de fusión (STAT5-ER). El receptor de estrógenos actúa como un agente inactivante de STAT5, ya que la proteína de fusión es inactiva porque forma un complejo con proteínas de choque térmico en el citosol, previniendo que la proteína STAT5 llegue al núcleo. Sin embargo, tras la incubación con 4-hidroxi-temoxifeno (4HT), la proteína de fusión (STAT5-ER) se disocia de las proteínas de choque térmico, y es transportada al núcleo  
 10 en su forma activa. La eliminación de 4HT produce el cese del crecimiento de las células de interés ya que la STAT5 expresada y el receptor de estrógenos permanecen asociados con las proteínas de choque térmico como un complejo y por lo tanto inactivos. Después estas células se diferencian terminalmente. Por lo tanto, en este ejemplo, el agente ER inactivante se puede conectar o desconectar usando 4HT.

**[0028]** Otro ejemplo de un agente inactivante, que se puede asociar con la proteína STAT5 es un sitio de unión del  
 15 factor de transcripción en dirección 5' o 3' del ácido nucleico que codifica la proteína STAT5, de modo que la expresión de la proteína STAT5 está bajo el control del factor de transcripción. Este agente inactivante se puede conectar y desconectar por la presencia o ausencia respectivamente de un factor de transcripción (o transactivador). La presencia o ausencia del transactivador se puede controlar manipulando su expresión o función en la célula.

**[0029]** Esto se puede lograr de forma conveniente proporcionando en la célula dos plásmidos, el primer plásmido  
 20 que codifique el factor de transcripción (transactivador) y el segundo plásmido que codifique STAT5. El segundo plásmido también comprende un sitio de unión del ácido nucleico para el transactivador en dirección 5' del ácido nucleico que codifica la proteína STAT5 de modo que la expresión de la STAT5 está bajo el control del transactivador. Después el agente inactivante se puede desconectar poniendo la célula en contacto con un agente que inactiva el transactivador. Eliminando el agente, el transactivador se activa y permite la expresión de STAT5. Un  
 25 ejemplo de dicho sistema es el sistema regulable por la tetraciclina como describen Bujard y colaboradores (Gossen y col. 1995).

**[0030]** También se describe en el presente documento una construcción de ácido nucleico para transformar células para así producir líneas celulares, comprendiendo dicha construcción de ácido nucleico la secuencia de  
 30 ácido nucleico que codifica una proteína STAT5 constitutivamente activa (STAT5a o STAT5b) y un agente inactivante de modo que la expresión del ácido nucleico produce una proteína de fusión que comprende dicha STAT5 y el agente inactivante.

**[0031]** La construcción de ácido nucleico puede ser ADN o ADNc, ARN o ADN genómico. Además se puede mantener en un vector de expresión, p. ej., un vector plasmídico o retrovírico. Además, la construcción de ácido nucleico puede estar operativamente unida a secuencias moduladoras tales como promotores o sitios de unión de  
 35 factores de transcripción como se ha mencionado antes, que ayudarán a su expresión. La construcción de ácido nucleico o vector que lo comprende puede estar contenido en una célula huésped. En una realización preferida, el agente inactivante es el receptor de estrógenos.

**[0032]** También se describe en el presente documento un kit para producir una línea celular que comprende células de interés, comprendiendo dicho kit al menos una construcción de ácido nucleico que comprende el ácido  
 40 nucleico que codifica una proteína STAT5 constitutivamente activa (STAT5a o STAT5b). La construcción de ácido nucleico puede codificar también un agente inactivante en asociación con la STAT5. El kit puede comprender además un agente de desasociación, p. ej., 4HT, que es capaz de desasociar la STAT5 de su agente inactivante.

**[0033]** Recientemente, se ha descrito que la expresión ectópica de BCL6 en linfocitos B de amígdala humana produce una proliferación potenciada de los linfocitos B y una prolongación considerable de la duración de vida de  
 45 estas células (Shvarts, 2002). Los autores de la presente invención han ampliado estos descubrimientos mostrando que la expresión de BCL-6 en linfocitos B periféricos de adulto también produce la potenciación de la respuesta proliferativa. Los linfocitos B periféricos transducidos con BCL-6 expresaban marcadores de activación de linfocitos B y CD19 y CD20. Además, los autores de la invención han observado una expresión de superficie celular uniforme de la cadena ligera Kappa (K) y Lambda (N), indicando que BCL-6 inhibe la diferenciación de los linfocitos B Ig+ en la  
 50 superficie celular en células plasmáticas. Fearon y colaboradores predijeron que la expresión de BCL-6 permite la autorenovación del centro germinal y linfocitos B de memoria (Reljic, 2000; Fearon, 2001). Los descubrimientos de los autores de la invención de que la expresión ectópica de BCL-6 en linfocitos B humanos produce una prolongación espectacular de la respuesta proliferativa inducida por CD40L y citoquinas, apoyan esta hipótesis.

**[0034]** Trabajos recientes han proporcionado comprensión sobre el mecanismo de control de la diferenciación de  
 55 los linfocitos B por BCL-6 puesto que parece que esta proteína reprime Blimp-1 (Turner, 1994), que dirige la diferenciación de células plasmáticas (Reljic, 2000; Shaffer, 2000; Shaffer, 2002). La represión de Blimp-1 por BCL-6 es indirecta y es mediada por el complejo AP-1 (Vasanwala, 2002). Se mostró que Blimp-1 inhibía la transcripción de c-myc, que es esencial para el progreso del ciclo celular de los linfocitos B cultivados con CD40L e IL-4 (Lin, 1997). Por lo tanto, es probable que la expresión ectópica de BCL-6 en linfocitos B desconecte Blimp-1 y por lo tanto

5 permita la expresión continuada de c-myc. Se demostró previamente que la ciclina D1 es expresada selectivamente en células transducidas con BCL-6, pero su función en el progreso del ciclo celular en linfocitos B transducidos con BCL-6 todavía no está claro (Shvarts, 2002). Además de afectar al progreso del ciclo celular en linfocitos B, la expresión ectópica de BCL-6 también puede inhibir la apoptosis. En relación con esto, es importante indicar que se

10 **[0035]** Dada la importante función de BCL-6 en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, es interesante saber cómo es regulado este gen. La presencia de sitios de consenso de STAT5 en el promotor de BCL-6 (Ohashi, 1995) impulsó a los autores de la invención a examinar si STAT5 regula BCL-6. Usaron una construcción CA-STAT5b-ER para demostrar que BCL-6 es regulada por aumento por STAT5b. Es importante que la regulación por aumento de los transcritos de BCL-6 no era sensible para la cicloheximida inhibidora de la síntesis de proteína, indicando que BCL-6 es un objetivo directo de STAT5b, al menos en linfocitos B.

15 **[0036]** Se obtuvo un apoyo adicional de la regulación de la expresión de BCL-6 por STAT5b en los linfocitos B por la observación de los autores de la invención de que la expresión constitutiva de un mutante de CA-STAT5b produce la extensión de la proliferación de los linfocitos B similar a BCL-6. La promoción de la expansión de los linfocitos B por la expresión ectópica de STAT5b no se debe a la transformación por el EBV, puesto que los linfocitos B transducidos con STAT5 son negativos para LMP-1 y EBNA 1/2 y también carecen de CD20, que es expresado en todos los linfocitos B transformados por EBV. Además, los linfocitos B transducidos con una construcción de CA-STAT5b regulable solo se expanden con STAT5b en el modo conectado, que excluye que la capacidad proliferativa

20 potenciada de los linfocitos B transducidos sea causada por un suceso de transformación secundario. Las observaciones de que STAT5b regula directamente BCL-6 sugieren que la inhibición de la diferenciación terminal es una forma mediante la cual se extiende espectacularmente la respuesta proliferativa hacia CD40L e IL-2 o IL-4 por la expresión ectópica de CA-STAT5b. Las células que expresan CA-STAT5b-ER y crecen con 4HT todavía necesitan CD40L y la IL-2 o IL-4 para un crecimiento óptimo. Por lo tanto, la activación de STAT5 en este sistema no es

25 suficiente por sí misma para sustituir completamente la señal proporcionada por los factores de crecimiento. Evidentemente, son necesarias otras rutas de transducción de señales, desencadenadas por las citoquinas y la unión de CD40, tales como PI-3K, NFkB y quinasa p38 (Andjelic, 2000; Dadgostar, 2002), para inducir el progreso del ciclo celular. Aunque los linfocitos B STAT5b-ER cultivados con 4HT pero sin CD40L y citoquinas no se expanden, tienen una ventaja de supervivencia comparado con células cultivadas sin 4HT (no se muestran los

30 resultados). Por lo tanto, parece que el exceso de expresión de CA-STAT5b además de inhibir la diferenciación terminal, tienen un efecto principal en la supervivencia de los linfocitos B maduros, que puede ser independiente de BCL-6. El apoyo para la idea de que STAT5b puede regular directamente factores implicados en la supervivencia de linfocitos B viene de un estudio que encuentra pruebas de la implicación de STAT5b en la expresión de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> en linfocitos T (Lord, 2000). Bcl-X<sub>L</sub> también es inducido por la expresión de un mutante activo constitutivo de

35 STAT5 en la línea celular BAF3 (Nosaka, 1999). Además de los sitios de unión de consenso de STAT5 en los promotores de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. Por lo tanto, es probable que las formas de STAT5 participen en la regulación de genes antiapoptóticos en linfocitos B primarios también.

40 **[0037]** Una cuestión importante que surge de los descubrimientos de los autores de la invención es si la expresión de BCL-6 depende estrictamente de STAT5. Los datos de la bibliografía no proporcionan pruebas en favor de la hipótesis de que STAT5a y b sean necesarias para la expresión o función de BCL-6, pero tampoco rechazan esta idea. Los ratones deficientes en BCL-6 carecen de centros germinales (Dent, 1997; Ye, 1997; Fukuda, 1997). Los linfocitos B de estos ratones son capaces de producir IgM e IgG1, indicando que hay capacidad para el cambio de isotipo (Toyama, 2002). La Ig producida en ratones deficientes en BCL-6 carece de mutaciones somáticas (Toyama, 2002). Los ratones deficientes dobles en STAT5a y b han reducido espectacularmente el número de linfocitos B en la periferia (Sexl, 2000). Sin embargo, se describió que el número absoluto de linfocitos B en el bazo era similar al de los ratones genéticamente intactos. También se mostró que estos ratones producían IgM e IgG1 (Sexl, 2000) pero no se sabe si se forman centros germinales en los ratones deficientes dobles en STAT5a y b y tampoco se sabe si se producen mutaciones somáticas en los genes de Ig de estos ratones. Evidentemente, el análisis de la expresión de BCL-6 en ratones deficientes dobles en STAT5a/b responderá la cuestión de si las proteínas STAT5 son

50 necesarias para la expresión de BCL-6.

55 **[0038]** Aunque la regulación por aumento de BCL-6 puede tener una función en el control de la supervivencia y crecimiento de linfocitos B por la STAT5, una serie de diferencias entre las células transducidas con CA-STAT5b y linfocitos B transducidos con BCL-6 sugieren que la regulación de BCL-6 no es la única explicación para los efectos de la activación continuada de CA-STAT5b en linfocitos B humanos cultivados. Una primera diferencia es que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b en el modo conectado crecen más rápido que los linfocitos B transducidos con BCL-6. Otra diferencia notable es que los linfocitos B transducidos con BCL-6 expresan regularmente Ig de superficie celular en la superficie celular, mientras que las células transducidas con CA-STAT5b pierden gradualmente la expresión de las slg con el cultivo continuado in vitro (no se muestran los resultados). Esta pérdida de expresión de las slg no va acompañada de un aumento de la secreción de Ig, un aumento de la expresión de

60 CD38 o la inducción de CD138 y por lo tanto no es una consecuencia de la diferenciación en células plasmáticas. Además, aunque la expresión en la superficie celular de una serie de antígenos de activación de linfocitos B como

CD40, CD70, CD80 y CD86 es muy similar, las células transducidas con CA-STAT5b expresan niveles mucho mayores de CD25 que las células transducidas con BCL-6. Evidentemente estas diferencias deben ser causadas por programas transcripcionales adicionales que son conectados con el nivel alto de expresión de STAT5b combinado con una activación continuada de CA-STAT5b. El análisis adicional de los genes que son conectados por la adición de 4HT a los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b-ER proporcionará más información sobre la función de STAT5b en la supervivencia, crecimiento y diferenciación de linfocitos B.

**[0039]** Por consiguiente, se describe además en el presente documento un procedimiento para seleccionar sustancias capaces de imitar la actividad de CA-STAT5, que comprende

1) poner en contacto una sustancia de ensayo con una célula capaz de expresar BCL-6 en un primer medio de reacción;

2) poner en contacto CA-STAT5 con una célula capaz de expresar BCL-6 en un segundo medio de reacción equivalente; y

3) comparar la expresión de BCL-6 en el primer medio de reacción con la del segundo medio de reacción para determinar si la sustancia de ensayo es capaz de imitar la actividad de CA-STAT5.

**[0040]** Preferiblemente, la actividad de CA-STAT5 es su capacidad para regular la expresión de BCL-6 en células de mamífero, preferiblemente linfocitos B.

**[0041]** La célula puede expresar de forma inherente/natural BCL-6, o la célula se puede haber modificado genéticamente para expresar BCL-6. La sustancia de ensayo y/o STAT5 (STAT5a o STAT5b) pueden ser expresados en la célula. En otras palabras, la célula se puede haber modificado genéticamente para expresar la sustancia de ensayo y/o STAT5.

**[0042]** La expresión de BCL-6 de la primera y segunda reacciones se puede comparar determinando si la célula deja de crecer y finalmente de diferenciarse terminalmente.

**[0043]** Un procedimiento alternativo para seleccionar sustancias capaces de imitar STAT5 (preferiblemente STAT5b) comprende las etapas de

1) transducir una célula, p. ej., un linfocito B, con STAT5-ER;

2) cultivar la célula en presencia de 4HT;

3) introducir una biblioteca de ADNc en la célula mediante un vector vírico, p. ej., un vector retrovírico;

4) desconectar STAT5 eliminando 4HT; y

5) seleccionar las células que continúan replicándose.

**[0044]** Las células que continúan replicándose comprenderán un gen que codifica una proteína capaz de imitar la actividad de STAT5. Por lo tanto, el procedimiento puede comprender además la etapa de secuenciar el ácido nucleico de aquellas células que continúan replicándose.

**[0045]** Ahora se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que acompañan.

**[0046]** En las figuras:

**Figura 1.** La expresión de CA-STAT5b conduce a la supervivencia y expansión de linfocitos B, mientras que la expresión de STAT5b natural produce solo supervivencia. Los linfocitos B se aislaron de una suspensión de amígdala, se cultivaron con CD40L, IL2 e IL-4 y se transdujeron con control GFP (c), STAT5b natural-GFP (n) o STAT5b activo constitutivo-GFP (ca), y se cultivaron otra vez con CD40, IL2 e IL-4. (a) Porcentajes de células GFP+, (b) número de células contadas en los cultivos.

**Figura 2.** Los linfocitos B en crecimiento transducidos con CA-STAT5b no lograron expresar los antígenos asociados a EBV, LMP1 y EBNA 1 ó 2.

**Figura 3.** Eficacia de clonación de linfocitos B transducidos con CA-STAT5b. Después de 2 meses de cultivo, las células CA-STAT5b-GFP+ se clonaron mediante separación de 1, 3, 10 y 100 células por pocillo de una placa de microvaloración de fondo redondo. Los cultivos se contaron 3-4 semanas más tarde.

**Figura 4.** Se cultivaron linfocitos B amigdalinos en CD40, IL2 e IL-4 y se transdujeron con CA-STAT5bER-IRES-ΔNGFR o con control-IRES-ΔNGFR. Se dividieron ambos cultivos, una parte se cultivó sin y otra con 4-hidroxi-tamoxifeno (4HT) 1 μM.

**Figura 5.** El crecimiento de linfocitos B depende de la expresión funcional continuada de CA-STAT5b. Se cultivaron linfocitos B transducidos con CA-STAT5bER-IRES- $\Delta$ NGFR con 4HT hasta que 100% de las células expresaban  $\Delta$ NGFR transducido. Después las células se cultivaron sin la hormona durante 7 días, después de lo cual el cultivo se dividió. Una parte se cultivó otra vez con 4HT y la otra sin 4HT.

## 5 Aislamiento de linfocitos B

**[0047]** Se obtuvieron amígdalas de amigdalectomías del departamento de cirugía para niños de la Universidad Libre de Ámsterdam. Los linfocitos B se redujeron drásticamente usando microperlas dirigidas contra CD4 y contra CD8 (Miltenyi Biotec). Después las células se incubaron con anticuerpos dirigidos contra CD19 conjugado con FITC (Dako) y anticuerpo dirigido contra CD3 conjugado con ficoeritrina (PE) (Becton Dickinson), seguido de separación de la población CD19+ CD3-. Los linfocitos B resultantes eran 95 a 98% puros tras el análisis de nuevo.

## Construcciones retrovíricas y producción de retrovirus recombinante

**[0048]** Los mutantes activos constitutivos de STAT5a y b se han descrito previamente (Ariyoshi y col., 2000; Onishi y col., 1998). Los ADN que codifican estos mutantes se obtuvieron de T. Kitamura, (IMSUT, Tokyo, Japón).  
 15 Estos ADN se ligaron en el vector LZRS-conector-IRES-GFP que se había descrito previamente (Heemskerk y col., 1997; Heemskerk y col., 1999). Los plásmidos retrovíricos se transfectaron en una línea celular productora de virus auxiliares no anfitriónicos Phoenix-A, un derivado de la línea de células renales embrionarias humanas 293 (Kinsella y Nolan, 1996) (un regalo generoso del Dr. G. Nolan, Stanford University, Palo Alto, CA), usando Fugene-6 (Roche Diagnostics) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Dos días después, la selección de las células  
 20 transfectadas se inició por la adición de puromicina 2  $\mu$ g/ml (Clontech Laboratories). De 10 a 14 días después de la transfección, se cultivaron  $6 \times 10^6$  células por placa petri de 10 cm (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) en 10 ml de medio completo sin puromicina. Al día siguiente, se renovó el medio y al día siguiente se recogieron los líquidos sobrenadantes retrovíricos, se centrifugaron y se congelaron en partes alícuotas exentas de células a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Este procedimiento proporciona una escala grande, rápida reproducible y una producción de retrovirus de valoración  
 25 alta de alrededor de  $3 \times 10^6$  partículas de virus infeccioso/ml.

**[0049]** Se hizo una construcción de fusión de CA-STAT5b y receptor de estrógenos (ER) como sigue: Se llevó a cabo una PCR con el mutante de STAT5b N604H (Ariyoshi y col., 2000; Onishi y col., 1998) para introducir un sitio BglII en lugar del codón de parada. Se generó un producto de digestión con XhoI/BglII que contenía la mutación. Este se ligó con una digestión con BamHI/EcoRI de pBS-ER (extremo C) y una digestión con XhoI/ EcoRI de pBS-SK+ para crear  $\Delta$ CA-STAT5bER. Después se ligó una digestión con XhoI/NotI de LZRS CASTAT5b-IRES- $\Delta$ NGFR a una digestión parcial con NotI/XhoI de pBS  $\Delta$ CASTAT5bER para crear LZRS CA-STAT5bER. Usando esto, los  
 30 autores de la invención hicieron una construcción con CA-STAT5b-ER en la dirección 3' de IRES y el receptor del factor de crecimiento nervioso  $\Delta$  ( $\Delta$ NGFR), un mutante incompetente para la señalización, eliminado de NGFR, proporcionado generosamente por el Dr C. Bonini (Bonini, 1997).

## 35 Procedimiento de transducción retrovírica

**[0050]** El procedimiento de transducción de fragmentos de fibronectina humana recombinantes CH-296 (RetroNectin™; Takara, Otsu, Japón) se basaba en un procedimiento desarrollado por Hanenberg y col. (Hanenberg y col., 1997; Hanenberg y col., 1996). Placas de 24 pocillos tratados de cultivo no tisular (Costar) se recubrieron con 0,5 ml de fragmento de fibronectina humana recombinantes CH-296 1  $\mu$ g/ml a temperatura ambiente durante 2 h o  
 40 durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . La disolución de CH-296 se separó, seguido de incubación con albúmina de suero humana al 2% (HAS) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de lavado una vez con PBS. Se cultivaron en placa  $5 \cdot 10^5$  linfocitos B en 0,25 ml de medio Iscove (Life Technologies) más suero bovino fetal al 10% (FCS) mezclado con 0,25 ml de líquido sobrenadante de retrovirus descongelado, incubado 6 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se separaron 0,25 ml de líquido sobrenadante y se añadieron 0,25 ml de líquido  
 45 sobrenadante de retrovirus de nueva aportación, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante la noche. La mañana siguiente las células se lavaron y se transfirieron a una placa tratada de cultivo tisular de 24 pocillos (Costar, Badhoevedorp, Países Bajos) con células L que expresaban CD40L irradiadas, IL-2 (20 U/ml) e IL-4 (50 ng/ml).

## Cultivo celular

**[0051]** Los linfocitos B se cultivaron en medio Iscove (Life Technologies) junto con FCS al 10% a  $37^{\circ}\text{C}$  en aire humidificado que contenía  $\text{CO}_2$  al 5%. Se sembraron células L que expresaban CD40L, irradiadas con 80 Gray, con  $5 \cdot 10^4$  células por pocillo en una placa tratada de tejido tisular de 24 pocillos (Costar). Se añadieron  $50 \cdot 10^4$  linfocitos B separados junto con IL-2 (20 U/ml) e IL-4 (50 ng/ml). Después de 1 semana las células se usaron para la transducción retrovírica. Después de transducción, los linfocitos B se cultivaron otra vez con células L que expresaban CD40L irradiadas, IL-2 e IL-4. Después de 1 semana las células se cultivaron con células L que  
 55 expresaban CD40L irradiadas, IL-2 e IL-10, durante 1 semana, seguido después de IL-2 e IL-10, seguido de IL-6 (30 U/ml).

**Fenotipado**

**[0052]** Se usaron anticuerpos contra las moléculas humanas CD3, CD19, CD20, CD38, CD40, CD80, CD45, HLA-DR, CD27, CD56, CD70, (Becton Dickinson) marcadas directamente con PE, PerCp o APC e IgM, cadena ligera kappa, cadena pesada lambda, CD138, marcadas directamente con PE (Dako) para el análisis por citometría de flujo. Las células teñidas se analizaron usando un aparato Facscalibur (Becton Dickinson) y los datos de FACS se procesaron con el software de ordenador Cell Quest (Becton Dickinson).

**Elisa**

**[0053]** La IgM, IgG y subtipos y la IgA en los líquidos sobrenadantes de los cultivos se detectaron por ELISA usando anticuerpos de conejo específicos de isotipo dirigidos contra Ig humana (Dako) como anticuerpos de captura e IgM, IgG e IgA conjugadas con fosfatasa alcalina (Dako), seguido de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma). Se usaron calibradores de proteínas de suero humano (Dako) para la curva patrón.

**RT-PCR**

**[0054]** Se recogió el ARN de sedimentos descongelados con el mini kit RNeasy® (Qiagen). Se hizo la transcripción inversa del ARN en un volumen de 20 µl, que contenía 5X el primer tampón de cadena, dNTP 500 µmol/l, Oligo (dT) 25 µg/l, superscript II RT 200 U (Life technologies). Se sometió 1 µl de ADNc a PCR en 50 µl de una disolución que contenía Tris-HCl 20 mmol/l, KCl 50 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/l, dNTP 5 mmol/l, ADN polimerasa Taq 2,5 U (Life Technologies), y 30 pmoles de cada cebador. La HPRT PCR era como sigue: etapa de desnaturalización de 7 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 30 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. La PCR de LMP-1 y EBNA era como sigue: etapa de desnaturalización de 7 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 30 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. Los oligonucleótidos usados para la (RT) PCR de transcriptasa inversa eran:

HPRT directo, 5'TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC3',

HPRT inverso, 5'GACACAAACATGATTCAAATCCCTGA3',

LMP-1 directo, 5'GCGACTCTGCTGGAAATGAT3';

LMP-1 inverso, 5'GACATGGTAATGCCTAGAAG3';

EBNA1/2 directo, 5'AGCAAGAAGAGGAGGTGGTAAG3';

EBNA1/2 inverso, 5'GGCTCAAAGTGGTCTCTAATGC3'.

BCL-6 directo, 5' AAGGGTCTGGTTAGTCCACAG 3'

BCL-6 inverso, 5' GGTCACACTTGTAGGGTTTGTG 3'

c-Myc directo 5' TCGGATTCTCTGCTCTCCTC 3'

c-Myc inverso 5' TTCCGCAACAAGTCCTCTTC 3'

hTERT directo 5' CTGCAGGCGTACAGGTTTCACG 3'

hTERT inverso 5' CCTCAGACTCCCAGCGGTGC 3'

**Resultados**

**35 Efecto de los mutantes activos constitutivos de STAT5 en el crecimiento de linfocitos B humanos**

**[0055]** Se ha descrito que los ratones deficientes en STAT5a y b tienen defectos en sus linfocitos B (Sexl y col., 2000). El número de linfocitos B en la sangre periférica se reduce mucho en estos ratones, pero no en el bazo o en la médula ósea. Además, hay deficiencias en el compartimento de linfocitos B temprano, como indica el número reducido de pro- y pre-linfocitos B en los ratones con desactivación doble de los genes de STAT5a y b (Sexl y col., 2000). El descubrimiento de que la introducción de ADNc que codifica un mutante de STAT5 activo induce el crecimiento independiente de IL-3 de la línea celular de prolinfocitos B BAF3 (Ariyoshi y col., 2000; Onishi y col., 1998) sugeriría que la activación de STAT5 a y b es necesaria para el avance del ciclo celular en las etapas tempranas del linaje de linfocitos B. Sin embargo, no se sabe si es necesaria la activación de STAT5 para la proliferación de linfocitos B maduros. Los autores de la invención han examinado esto analizando los efectos de los mutantes activos de STAT5 a y b en la expansión in vitro de linfocitos B maduros.

**[0056]** Se aislaron linfocitos B CD19+ amigdalinos como se ha indicado en materiales y procedimientos. Estas células se cocultivaron con IL-2, IL-4 y fibroblastos de ratón que se transfectaron con CD40L (CD154). Dos días más

tarde las células se transdujeron con (CA) STAT5-IRES-GFP constitutivo activo (STAT5a y STAT5b), con STAT5b natural o con un IRES-GFP de control. Las eficacias de la transducción eran 5% (Fig. 1). Las células se expandieron la primera semana en CD40L e IL-2 e IL-4 y después en una combinación de CD40L, IL-2 e IL-10 para promover más crecimiento. Las primeras 3 semanas de cultivo, estos porcentajes de células GFP+ en los diferentes cultivos no cambiaron. Sin embargo, empezando con 3 semanas de cultivo, el porcentaje de células GFP+ en los cultivos transducidos con CA-STAT5a (no se muestra) y b (Fig. 1) aumentaron con el tiempo. La semana 7 los linfocitos B de control-transducidos y los no transducidos empezaron a morir. La semana 8 >95% de los cultivos transducidos con CA-STAT5a y b eran GFP+ y continuaban expandiéndose. Los linfocitos B transducidos con STAT5b natural sobrevivieron pero no se expandieron (Figura 1a y b), indicando que es necesaria la activación de STAT5 para la expansión de los linfocitos B.

[0057] Para ensayar los requisitos de citoquina de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5, el cultivo expandido en IL-10 se dividió y se cultivó adicionalmente con IL-10, IL-6 o sin citoquinas. Las células de los tres cultivos se expandieron igualmente bien. El descubrimiento de que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 se expandían en ausencia de citoquinas puede sugerir que CA-STAT5 pasa por alto una señal mediada por citoquinas que conduce al progreso del ciclo celular continuo o la STAT5 activa induce la secreción de una citoquina que media el crecimiento celular. Un segundo experimento con linfocitos B amigdalinos de otro donante dio resultados idénticos. En ese experimento, las eficacias de transducción al inicio del cultivo eran entre 10 y 20%. Igualmente, como en los primeros experimentos, las células no transducidas y las de control-transducidas detuvieron el crecimiento después de 6-7 semanas, mientras que las células transducidas con STAT5a y b continuaron expandiéndose.

[0058] Los descubrimientos de los autores de la invención sugieren que las células transducidas con STAT5 tienen una duración de la vida replicativa prolongada comparadas con los linfocitos B normales. Puesto que el virus de Epstein-Barr (EBV) puede immortalizar los linfocitos B y las células transformadas por el EBV pueden aparecer “espontáneamente” en cultivos de linfocitos B amigdalinos, era importante excluir que la prolongación de la duración de la vida de las células transducidas con CA-STAT5 no se debía a la transformación por el EBV. Las células transformadas por el EBV expresan invariablemente CD20 y el descubrimiento de que los linfocitos B transducidos con STAT5 carecían de CD20, sugería ya que no son transformados por el EBV. Esto se confirmó por la observación de que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b no expresaban el ARNm de LMP-1 o EBNA 1/2 como se evaluó por una RT-PCR sensible (Fig. 2).

[0059] Los experimentos representados en las figuras 1 y 2 se llevaron a cabo con linfocitos B amigdalinos. Para asegurar la validez general de este procedimiento para prolongar la duración de la vida de los linfocitos B, los autores de la invención cultivaron linfocitos B de sangre periférica con CD40L, IL-2 e IL-4, y transdujeron estas células con CA-STAT5b. Alrededor del día 30 después de iniciarse el cultivo, la proporción de células GFP+ empezó a aumentar para alcanzar 100% dos semanas después (no se muestran los resultados), similar a lo que observaron los autores de la invención con los linfocitos B amigdalinos.

#### Fenotipo de los linfocitos B expandidos

[0060] Después de 3 semanas de cultivo, estas células expresaban niveles bajos de CD19 y CD20. Además, en este momento 83% de las células expresaban CD38 (no se muestran los resultados). Estos resultados indicaban que muchos linfocitos B se diferenciaban en células plasmáticas. El fenotipo de las células transducidas con CA-STAT5 “seleccionadas” (>95% GFP+) es diferente. El nivel de CD19 es mayor pero menor que en linfocitos B recién aislados (Tabla 1). La expresión de CD38 en células transducidas con CA-STAT5 disminuyó con el tiempo y su expresión finalmente se hizo menor que en las células cultivadas durante 3 semanas. Las células transducidas con CA-STAT5 permanecieron negativas para CD20, pero también eran negativas para CD27. Este fenotipo sugiere fuertemente que las células no son células plasmáticas, puesto que las células plasmáticas expresan solo niveles muy bajos de CD19, y son CD38+ y CD27 positivas. Las células transducidas con CA-STAT5 además eran negativas para la IgM de superficie celular (no se muestran los resultados).

#### Clonación de linfocitos B transducidos con STAT5

[0061] Dada la prolongación espectacular de la duración de la vida replicativa de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5, era interesante investigar si estas células se pueden clonar. La immortalización de los linfocitos B no conduce necesariamente a eficacias de clonación altas, puesto que es difícil clonar linfocitos B transformados por el EBV. Los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 se sembraron con diluciones limitantes en pocillos de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo. Se sembraron 288 pocillos con 1 célula/pocillo, 192 con 3 células/pocillo y 96 con 10 células/pocillo. Basándose en la posibilidad de que los linfocitos B transducidos con STAT5 produzcan un factor de crecimiento autocrino, los autores de la invención usaron linfocitos B transducidos con STAT5 irradiados (40 Gy) como células nutrientes. Los cultivos en crecimiento eran visibles 14-21 días después del comienzo de los microcultivos. El aspecto de estos clones no se debía al crecimiento de los linfocitos B irradiados, ya que las placas sembradas solo con células irradiadas no dieron ningún cultivo en crecimiento. La eficacia de la clonación calculada a partir de los resultados del recuento de pocillos con cultivos en crecimiento era de 7% (Fig. 3). Se transfirieron 50 clones a pocillos de una placa de 24 pocillos para ensayar la estabilidad de los

clones. Todos los clones se podían expandir durante al menos 4 semanas. Estos resultados indican que los linfocitos B transducidos con STAT5 se pueden clonar con una eficacia notablemente alta.

#### **Producción de Ig por linfocitos B transducidos con CA-STAT5 poli y monoclonales**

**[0062]** La producción de IgG de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 se ensayó usando un análisis de ELISA como se ha descrito en material y procedimientos. Se cultivaron medio millón de células durante 3 días en medio con FCS al 5%, después de lo cual se recogió el líquido sobrenadante y se ensayó. Las células transducidas con CA-STAT5 parentales producían IgG, pero la cantidad de IgG disminuyó tras continuar el cultivo. Aunque en algunos experimentos ilustrados en la tabla 2, primera columna, se produjo aproximadamente 1 µg de IgG/ml, los niveles eran mucho menores cuando se ensayaron los cultivos en un tiempo posterior de cultivo (ilustrado en el ejemplo 2). Algunos clones producían IgG en el mismo orden de magnitud (tabla 2), mientras que otros clones no lograron producir IgG (no se muestran los datos). Estos datos parecen indicar que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b pierden su capacidad de producir Ig tras el cultivo prolongado.

#### **Generación de líneas de linfocitos B después de inducción de la expresión de CA-STAT5 b con tamoxifeno**

**[0063]** La observación de que las líneas de linfocitos B transducidos con CA-STAT5b de cultivos de larga duración a menudo perdían su capacidad para producir Ig, plantea la cuestión de si estas células han perdido o no de forma irreversible su capacidad para diferenciarse en células productoras de Ig. Si CA-STAT5 b inhibe reversiblemente la diferenciación terminal, puede ser posible inducir la diferenciación terminal desconectando CA-STAT5b. Para examinar esto, los autores de la invención prepararon una fusión del receptor de estrógenos (ER) con CA-STAT5b. El producto de fusión se expresa en las células transducidas como un complejo inactivo con proteínas de choque térmico. Tras la incubación con 4-hidroxi-tamoxifeno (4HT), el producto de fusión se disocia y es transportado al núcleo. Los linfocitos B amigdalinos se transdujeron con CA-STAT5bER-IRES-ΔNGFR y se cultivaron en CD40L, IL-2 e IL-4 en presencia o ausencia de 4HT 1 µM. La figura 4 muestra claramente que la selección de crecimiento de células que expresan CA-STAT5b (ΔNGFR+) solo se produce en presencia de 4HT. Es importante que la eliminación de 4HT daba como resultado el cese del crecimiento de los linfocitos B y finalmente la muerte. Los linfocitos B transducidos con CA-STAT5bER cultivados con CD40L, IL2 e IL-4 cultivados en ausencia de 4HT inicialmente proliferaron, pero dejaron de crecer después de 14-20 días. Tres días más tarde las células empezaron a morir. Cuando se volvió a añadir 4HT después de 7 días, las células sobrevivieron y continuaron creciendo posteriormente (Fig. 5). Estos resultados indican que el crecimiento de los linfocitos B inducido por CA-STAT5b no es una consecuencia de los cambios genéticos irreversibles inducidos por CA-STAT5b que transforma los linfocitos B, sino que también depende de la expresión funcional continuada de CA-STAT5b.

**[0064]** Los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b-ER cultivados en CD40L, IL2, IL-4 y 4HT expresan niveles bajos de IgM de superficie celular con expresión de 45% de cadena kappa y 40% de cadena lambda, indicando que son policlonales (Fig. 6). Las células eran negativas para la IgD de superficie celular, y un porcentaje pequeño (1-2%) expresaba IgG y carecía de IgM. Además expresan CD38, CD40, CD70, CD80 y HLA-DR, pero son débilmente positivas para CD20 y son negativas para CD27. CD25 era altamente expresado en estas células (Fig. 8) de acuerdo con el hecho de que STAT5b controla directamente la transcripción de CD25 (IL-2Rα) [John, 1996 John, S., Robbins, C. M., y Leonard, W. J. (1996)]. Un elemento de respuesta de IL-2 en el promotor de la cadena alfa del receptor de IL-2 humano es un elemento compuesto que se une a Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) y una proteína de la familia GATA. *Embo. J.* 15, 5627-5635.

**[0065]** John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J. E., y Leonard, W. J. (1999). "The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5". *Mol. Cell Biol.* 19, 1910-1918. ; John, 1999].

**[0066]** El descubrimiento de que los cultivos de linfocitos B amigdalinos transducidos con CA-STAT5b-ER contenían linfocitos B IgM+ y solo algunos linfocitos B IgG+, puede ser una consecuencia del hecho de que los linfocitos B amigdalinos son principalmente células IgM+. Sin embargo, también era posible que la expresión de CA-STAT5b condujera al crecimiento selectivo de linfocitos B IgM+. Por lo tanto, los autores de la invención examinaron los efectos de este mutante en el crecimiento de células IgG+. Para estos experimentos usaron linfocitos B de sangre periférica (PB) de adultos. Los autores de la invención cultivaron linfocitos B de PB purificados, los transdujeron con CASTAT5b-ER-IRES-GFP. Los linfocitos B transducidos después se separaron en células IgM+ e IgG+ y se cultivaron más en presencia de 4HT durante 35 días. La figura 7 muestra claramente que la expresión de CASTAT5b-ER-IRES-GFP produce el crecimiento dependiente de 4HT de los linfocitos B tanto positivos para IgM como para IgG. Los análisis posteriores de los fenotipos de estas células pusieron de manifiesto que el fenotipo de las células IgG+ con respecto a la expresión de CD25, CD38, CD40, CD70, CD80, HLA-DR, CD20 y CD27 era el mismo que el fenotipo de los linfocitos B de amígdala cultivados (no se muestran los resultados).

#### **Producción de anticuerpos de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5bER**

**[0067]** Se estableció un cultivo de linfocitos B amigdalinos cultivando linfocitos B transducidos con CA-STAT5bER con CD40L, IL2, IL-4 y 4HT. Después de seleccionar las células que expresaban ΔNGFR+ (CA-STAT5bER), se estableció una línea que era dependiente de 4HT (véase el apartado anterior). Los autores de la invención

observaron que esta línea no secretaba IgG pero si algo de IgM. Además cuando las células se transferían a IL-2 e IL-10 y se cultivaban durante 3 días, estas células no producían ninguna Ig. Sin embargo, cuando se cultivaron primero en CD40L, IL2 e IL-4 durante 14 días sin 4HT, las células se volvieron permisivas para la diferenciación inducida por IL-2/IL-10 para las células productoras de Ig (700 ng de IgM ml/10<sup>6</sup> células).

- 5 **[0068]** Los autores de la invención han descrito como ejemplo de la presente invención, un procedimiento para expandir y clonar linfocitos B humanos. La introducción de un mutante constitutivo de STAT5a o b confiere una prolongación espectacular de la duración de la vida replicativa a los linfocitos B humanos. Es interesante que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 finalmente crecen de una forma independiente de citoquinas. Esto no se debe a la transformación por EBV puesto que los linfocitos B transducidos con STAT5 son negativos para LMP-1 y
- 10 EBNA 1/2. Además, los linfocitos B transducidos con STAT5 carecen de CD20, que es expresado en todos los linfocitos B transformados por EBV.

- [0069]** El mecanismo subyacente en la independencia de citoquinas de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 todavía no se conoce. Una posible explicación para la independencia de las citoquinas es que la expresión de CA-STAT5 da como resultado la producción de un factor de crecimiento autocrino. Esto no es una posibilidad
- 15 remota puesto que hay una citoquina, la citoquina similar a IL-6 oncostatina M (OSM) que es un objetivo directo de STAT5. Otra posibilidad es que CA-STAT5 por si misma induzca el progreso del ciclo celular continuado. CA-STAT5 también puede prevenir la diferenciación terminal de los linfocitos B en células plasmáticas, lo cual va acompañado de la muerte celular creciente. Este concepto está de acuerdo con la observación de que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5bER, que crecen en presencia de 4HT, se vuelven permisivos para la diferenciación solo
- 20 después de la eliminación del 4HT.

- [0070]** El fenotipo de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5 recuerda a los linfocitos B CD19+CD20- (memoria). Sin embargo, debe indicarse que las células son negativas para CD27, que normalmente es expresado en linfocitos B de memoria. Puesto que las células todavía expresan CD19 y CD40, que están ausentes en las células plasmáticas, no se han diferenciado a la etapa de célula plasmática. Esto también podría ser una explicación
- 25 de la producción baja y variable de Ig por los linfocitos B que expresan constitutivamente CA-STAT5b funcional. Para superar este problema, los autores de la invención han expresado con éxito una CA-STAT5b inducible, lo cual les permite expandir los linfocitos B con CA-STAT5b en el modo conectado e inducir la diferenciación terminal de los linfocitos B después de desconectar STAT5b. La observación de que 4HT induce el crecimiento de linfocitos B que expresan una proteína de fusión CA-STAT5bER no solo demuestra que el crecimiento de los linfocitos B depende
- 30 solo de la expresión nuclear funcional del mutante STAT5b sino que también presentaba una forma de inducir la diferenciación terminal en las células plasmáticas por eliminación de 4HT. Realmente, un cultivo de linfocitos B que no logra secretar IgG o IgM cuando se cultiva en 4HT se vuelve permisivo para la diferenciación terminal 14 días después de la eliminación de 4HT. Esta observación sugiere fuertemente que aunque CA-STAT5b promueve la supervivencia y el crecimiento de linfocitos B, inhibe la diferenciación terminal.

- 35 **[0071]** Por lo tanto, como ejemplo de la presente invención, se proporciona un procedimiento con el que se puede expandir y clonar linfocitos B en los que está inhibida la diferenciación terminal. Una vez que se han establecido los clones desconectando CA-STAT5, se puede inducir la producción de Ig para seleccionar los clones que producen anticuerpos con una especificidad deseada. Los genes de Ig de los linfocitos B transducidos con CA-STAT5ER seleccionados se pueden recuperar y expresar bajo el control de promotores fuertes en líneas celulares establecidas
- 40 tales como líneas celulares de CHO o de mieloma (Little y col., 2000). Las células CHO modificadas ya se han usado para expresar genes de Ig murina y las células de CHO transfectadas con Ig producen niveles altos de anticuerpo monoclonal (10-20 µg/ml).

**La expresión ectópica de BCL-6 en linfocitos B de sangre periférica humana produce la prolongación de la duración de la vida replicativa de las células y el mantenimiento de la inmunoglobulina de superficie celular**

- 45 **[0072]** Recientemente, se ha publicado que la expresión ectópica de BCL-6 en linfocitos B amigdalinos humanos de niños pequeños produce una ventaja de crecimiento de linfocitos B cuando se cultivan en CD40L, IL2 e IL-4. Estas células expresaban CD19 y eran negativas para CD3 y CD56. Para estudiar si BCL-6 también afecta a la capacidad proliferativa de los linfocitos B de sangre periférica de adulto, los autores de la invención introdujeron BCL-6-IRES-GFP en linfocitos B humanos cultivados con linfocitos L que expresan CD40L, IL2 e IL-4. La expresión
- 50 de BCL-6 da una ventaja de crecimiento de los linfocitos B periféricos que expresan el marcador GFP a partir de 10 días después de la transducción de BCL-6. Para obtener información sobre el fenotipo de estas células, los autores de la invención llevaron a cabo un análisis exhaustivo con un panel de anticuerpos monoclonales. Los linfocitos B transducidos con BCL-6 expresaban CD19 pero son negativos para los marcadores de linfocitos T y células NK CD3 y CD56. Además las células transducidas con BCL-6 expresaban CD20, eran muy débilmente positivas para CD38
- 55 pero eran negativas para el marcador de linfocitos B de memoria CD27 y el marcador de células plasmáticas CD138. Además, las células expresaban los marcadores de activación HLA-DR, CD40 y CD70 y eran débilmente positivas para CD80 y CD25. Es importante que los linfocitos B transducidos con BCL-6 expresaban Ig K (Kappa) o λ (Lambda) de superficie celular, de acuerdo con el hecho de que estas células son detenidas en la diferenciación en células plasmáticas negativas para Ig de superficie celular.

**[0073]** Estos datos confirman los datos anteriores con linfocitos B amigdalinos, que indicaban que cuando los linfocitos B son bloqueados en su diferenciación, crecen mucho más tiempo en respuesta a CD40L y citoquinas.

#### **BCL-6 es regulado por CA-STAT5b**

**[0074]** Los factores que promueven el crecimiento de linfocitos B activan la STAT5, que potencialmente puede controlar la expresión de BCL-6, puesto que la inspección de un promotor de 1,5 kb de BCL-6 (Ohashi, 1995) puso de manifiesto la presencia de dos sitios consenso de STAT5 aumentando la posibilidad de que STAT5 regule BCL-6. Para examinar esto, los autores de la invención usaron la construcción vírica recombinante que alberga CA-STAT5b-ER en dirección 5' de IRES-( $\Delta$ ) delta NGFR.  $\Delta$ NGFR es un mutante incompetente para la señalización, truncado, del receptor del factor de crecimiento nervioso (Bonini, 1997). Después de la transducción,  $\Delta$ NGFR es expresado en la superficie celular y se puede detectar con un anticuerpo monoclonal (Bonini, 1997). Después de la transducción, el producto de fusión CASTAT5b-ER es expresado en el citoplasma de las células transducidas como un complejo inactivo con proteínas de choque térmico. Después de incubación con 4-hidroxi-tamoxifeno (4HT) el producto de fusión se disocia y es transportado al núcleo. Realmente, la tinción de los linfocitos B  $\Delta$ NGFR+ transducidos, con un anticuerpo dirigido contra ER en ausencia o presencia de 4HT, ilustra que CASTAT5b se localiza como se esperaba de una forma dependiente de 4HT. El análisis de transferencia Western confirmó la presencia de la proteína de fusión del PM esperado en las células transducidas.

**[0075]** Los autores de la invención después cultivaron linfocitos B de amígdala transducidos con CASTAT5b-ER durante 7 días, en ausencia de 4HT y después volvieron a añadir 4HT. Las células se recogieron 24 h más tarde y se ensayó la expresión de BCL-6 por RT-PCR. La expresión de los transcritos de BCL-6 es sustancialmente mayor en el cultivo con 4HT que en el cultivo sin esta hormona. Para determinar si BCL-6 es un objetivo directo o indirecto de STAT5b, se añadió el inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida junto con el 4HT. También se observó la regulación por aumento del ARNm de BCL-6 cuando se añadieron tanto 4HT como cicloheximida. Estos datos indican que la expresión del ARNm de BCL-6 está controlada directamente por STAT5b.

#### **Efecto de los mutantes activos constitutivos de STAT5 en el crecimiento de linfocitos B humanos.**

**[0076]** La observación de que BCL-6 es un objetivo directo de las proteínas STAT5 en los linfocitos B, llevó a los autores de la invención a investigar si STAT5 tiene una función similar a BCL-6 en la regulación de la supervivencia, crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Los autores de la invención ensayaron los efectos de STAT5 natural (WT) y mutantes activos constitutivos (CA) en el crecimiento de los linfocitos B humanos. Los linfocitos B amigdalinos CD19+ se aislaron como se ha indicado en materiales y procedimiento. Estas células se cocultivaron con IL-2, IL-4 y fibroblastos de ratón transfectados con CD40L (CD154). El día 7, las células se transdujeron con CA-STAT5a-IRES-GFP, CASTAT5b-IRES-GFP, WT-STAT5b-IRES-GFP o con un IRES-GFP de control. Las eficacias de transducción eran 5%-20%. Los porcentajes de células GFP+ en los diferentes cultivos no cambiaron las primeras tres semanas de cultivo en IL-2, IL-4 y CD40L. Sin embargo, empezando con 21-25 días de cultivo, el porcentaje de células GFP+ en los cultivos transducidos con CA-STAT5 a y b aumentó a lo largo del tiempo. La semana 6-7, los linfocitos B de control-transducidos y los no transducidos empezaron a morir. La semana 8, más de 95% de los cultivos transducidos con CA-STAT5b eran GFP+ y continuaron expandiéndose. Los linfocitos B transducidos con WT-STAT5b sobrevivieron pero no se expandieron indicando que la activación de STAT5 es necesaria para la expansión de los linfocitos B. Los linfocitos B expandidos expresaban CD19, pero carecían de CD20. Esta observación sugieren fuertemente que la prolongación de la duración de la vida replicativa de las células transducidas con CA-STAT5 no se debía a la transformación por el EBV, puesto que los linfocitos B transformados por EBV expresan CD20. Esto se confirmó por la observación de que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b no expresaban ARNm de LMP-1 o EBNA 1/2, evaluado por una RT-PCR sensible. Es importante que los linfocitos B transducidos con CA-STAT5b expresaban varios segmentos de genes variables de Ig, indicando que la línea no es monoclonal.

#### **45 Generación de líneas de linfocitos B después de inducción de la expresión de CA-STAT5b con tamoxifeno**

**[0077]** La observación de que CA-STAT5b prolonga la duración de la vida de los linfocitos B de amígdala humanos, podía estar causada por sucesos secundarios que producen la transformación de las células. Si este fuera el caso, la desconexión de STAT5b no debería afectar al crecimiento de los linfocitos B ya transformados. Para investigar esto, los autores de la invención usaron la construcción CA-STAT5b-ER-IRES- $\Delta$ NGFR. Después de cultivo de los linfocitos B amigdalinos transducidos con CASTAT5b-ER IRES- $\Delta$ NGFR en CD40L, IL-2 e IL-4 en presencia o ausencia de 4HT 1  $\mu$ M, solo se producía una selección de crecimiento de células que expresaban CA-STAT5b ( $\Delta$ NGFR+) en presencia de 4HT. Es importante que la eliminación de 4HT producía la terminación del crecimiento de los linfocitos B y finalmente la muerte. Los linfocitos B transducidos cultivados con CD40L, IL2 e IL-4 en ausencia de 4HT inicialmente proliferaron, pero dejaron de crecer y después de 7-20 días murieron. Cuando se volvió a añadir 4HT después de 7 días, las células sobrevivieron y después continuaron creciendo. Estos resultados indican que el crecimiento inducido por CA-STAT5b de los linfocitos B de amígdala no es una consecuencia de cambios genéticos irreversibles inducidos por CA-STAT5b que transforma los linfocitos B, sino que solo depende de la expresión funcional continuada de CA-STAT5. Los linfocitos B de amígdala transducidos con CA-STAT5b-ER y

cultivados en CD40L, IL2, IL-4 y 4HT expresan niveles bajos de IgM de superficie celular, con 45% de expresión de la cadena K y 40% de la  $\lambda$ , indicando que son policlonales. Las células eran negativas para la IgD de superficie celular y un porcentaje pequeño (1-2%) expresaba IgG y carecía de IgM. Además, expresan CD38, CD40, CD70, CD80 y HLA-DR, pero son débilmente positivas para CD20 y son negativas para CD27. CD25 era altamente expresado en estas células, de acuerdo con el hecho de que STAT5 controla directamente la transcripción de CD25 (IL-2R $\alpha$ ) [John, 1996; John, 1999].

**[0078]** El descubrimiento de que cultivos de linfocitos B de amígdala transducidos con CA-STAT5b-ER contenían linfocitos B IgM+ y solo algunos linfocitos B IgG+, puede ser una consecuencia del hecho de que los linfocitos B de amígdala son principalmente células IgM+. Sin embargo, también era posible que la expresión de CA-STAT5b condujera al crecimiento selectivo de linfocitos B IgM+. Por lo tanto, los autores de la invención examinaron los efectos de este mutante en el crecimiento de las células IgG+. Para estos experimentos, usaron linfocitos B de sangre periférica de adulto. Los autores de la invención cultivaron linfocitos B de PB purificados, y los transdujeron con CASTAT5b-ER-IRES-GFP. Los linfocitos B transducidos después se separaron en células IgM+ e IgG+ y se cultivaron más en presencia de 4HT durante 35 días. La expresión de CASTAT5b-ER-IRES-GFP produce el crecimiento dependiente de 4HT de los linfocitos B tanto positivos para IgM como para IgG. Los análisis posteriores de los fenotipos de estas células pusieron de manifiesto que el fenotipo de las células IgG+ con respecto a la expresión de CD25, CD38, CD40, CD70, CD80, HLA-DR, CD20 y CD27 era el mismo que el fenotipo de los linfocitos B de amígdala cultivados.

## Referencias

20 **[0079]**

Andjelic, S., Hsia, C., Suzuki, H., Kadowaki, T., Koyasu, S., y Liou, H. C. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *J. Immunol.* 165, 3860-3867.

Ariyoshi, K., Nosaka, T., Yamada, K., Onishi, M., Oka, Y., Miyajima, A., y Kitamura, T. (2000). Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain, *J. Biol. Chem.* 275, 24407-13.

Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., y Rousset, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40, *Science* 251, 70-2.

Baron, B. W., Anastasi, J., Thirman, M. J., Furukawa, Y., Fears, S., Kim, D. C., Simone, F., Birkenbach, M., Montag, A., Sadhu, A., y col. (2002). The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: Implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2860-2865.

Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., y Bordignon, C. (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719-1724.

Chang, C. C., Ye, B. H., Chaganti, R. S., y Dalla-Favera, R. (1996). BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6947-6952.

Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X. F.; Truong, U., Rao, G., Baltimore, D., y Cheng, G. (2002). Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1497-1502.

Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., y Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.

Fearon, D. T., Manders, P., y Wagner, S. D. (2001). Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* 293, 248-250.

Fishwild, D. M., O'Donnell, S. L., Bengoechea, T., Hudson, D. V., Harding, F., Bernhard, S. L., Jones, D., Kay, R. M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., y Lonberg, N. (1996). High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice, *Nat. Biotechnol.* 14, 845-51.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirosawa, S., Taniguchi, M., y col. (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J. Exp. Med.* 186, 439-448.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., y Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells, *Science* 268 1766-1769.

Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R. A., Kato, I., y Williams, D. A. (1997). Optimization of fibronectin-

- assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.* 8, 2193-206.
- Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., y Williams, D. A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* 2, 876-82.
- Heemskerk, M. H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A. P., Bakker, A. Q., Weijer, K., Res, P. C., y Spits, H. (1997).  
5 Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3, *J. Exp. Med.* 186, 1597-602.
- Heemskerk, M. H., Hooijberg, E., Ruizendaal, J. J., van der Weide, M. M., Kueter, E., Bakker, A. Q., Schumacher, T. N., y Spits, H. (1999). Enrichment of an antigen-specific T cell response by retrovirally transduced human dendritic cells, *Cell Immunol.* 195, 10-7.
- 10 Hoogenboom, H. R., y Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology, *Immunol. Today* 21, 371-8.
- John, S., Robbins, C. M., y Leonard, W. J. (1996). An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *Embo. J.* 15, 5627-5635.
- 15 John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J. E., y Leonard, W. J. (1999). The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol. Cell Biol.* 19, 1910-1918.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321, 522-5.
- Karpas, A., Dremucheva, A., y Czepulkowski, B. H. (2001). A human myeloma cell line suitable for the generation of  
20 human monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1799-804.
- Kinsella, T. M., y Nolan, G. P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus., *Human Gene Therapy* 7, 1405-1413.
- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596-599.
- 25 Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., y Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies, *Immunol. Today* 21, 364-70.
- Lord, J. D., McIntosh, B. C., Greenberg, P. D., y Nelson, B. H. (2000). The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J. Immunol.* 164, 2533-2541.
- 30 Malisan, F., Briere, F., Bridon, J. M., Harindranath, N., Mills, F. C., Max, E. E., Banchereau, J., y Martinez- Valdez, H. (1996). Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes, *J. Exp. Med.* 183, 937-47.
- Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., y col. (1997). Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates  
35 human antibody response in mice, *Nat. Genet.* 15, 146-56.
- Moriggl, R., Sexl, V., Piekorz, R., Topham, D., y Ihle, J. N. (1999). Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells, *Immunity* 11, 225-30.
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., y Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-5.
- 40 Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., y Kitamura, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo. J.* 18, 4754-4765.
- Ohashi, K., Miki, T., Hirose, S., y Aoki, N. (1995). Characterization of the promoter region of human BCL-6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 461-467.
- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., y Kitamura, T. (1998).  
45 Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation, *Mol. Cell Biol.* 18, 3871-9.
- Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J., y Fearon, D. T. (2000). Suppression of signal transducer and activator of transcription 3- dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J. Exp. Med.* 192, 1841-1848.

- Roder, J. C., Cole, S. P., y Kozbor, D. (1986). The EBV-hybridoma technique, *Methods Enzymol.* 121, 140-67.
- Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., y Ihle, J. N. (2000). Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* 96, 2277-2283.
- 5 Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., y Ihle, J. N. (2000). Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5, *Blood* 96, 2277-83.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., y Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology, *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-55.
- 10 Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., y Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., y Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.
- 15 Shvarts, A., Brummelkamp, T., Scheeren, F., Koh, E., Daley, G. Q., Spits, H., y Bernards, R. (2002). A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of antiproliferative p19ARF- p53 signaling. *Genes Dev.* pendiente de publicación.
- Staudt, L. M., Dent, A. L., Shaffer, A. L., y Yu, X. (1999). Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL- 6. *Int Rev Immunol* 18, 381-403.
- 20 Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., y Tokuhisa, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17, 329-339.
- Turner, C. A., Jr., Mack, D. H., y Davis, M. M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
- 25 Vasanwala, F. H., Kusam, S., Toney, L. M., y Dent, A. L. (2002). Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J. Immunol.* 169, 1922-1929.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., y col. (1997). The BCL-6 protooncogene controls germinal-centre formation and Th2-type  
30 inflammation. *Nat. Genet.* 16, 161-170.
- Ye, B. H., Rao, P. H., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1993). Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 53, 2732-2735.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento in vitro de estabilización de una línea celular de linfocitos B maduros, que comprende las etapas de introducir un transductor de señal constitutivamente activo de una proteína de activación y transcripción (CA-STAT) en un linfocito B maduro; y mantener dicha célula en un entorno en el que se puede replicar; en el que dicha proteína STAT es STAT5, STAT5a o STAT5b.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el entorno comprende uno cualquiera o más de la IL-2, CD40L e IL-4.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la proteína CA-STAT5 se introduce en la célula por transducción.
- 10 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína CA-STAT está unida a un agente inactivante que tiene un estado conectado y un estado desconectado, en el que la célula se mantiene con el agente inactivante en el estado desconectado.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente inactivante es un sistema promotor/de escisión inducible, ácido nucleico de sentido contrario, o una proteína que se asocia con STAT5 como una proteína de fusión.
- 15 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el sistema promotor/de escisión inducible es el sistema de escisión cre-lox o FLP/FRT.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico de sentido contrario es ARNi.
- 20 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la proteína asociada forma una proteína de fusión con CA-STAT y se puede inactivar por un cambio en el entorno.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la proteína asociada es una molécula receptora.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la proteína asociada es un receptor de estrógenos.
- 25 11. Un procedimiento in vitro de inducción de diferenciación terminal en un linfocito B, que se ha estabilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10; que comprende conectar dicho agente inactivante haciendo así la proteína STAT5 inactiva e induciendo la diferenciación terminal.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, que además comprende la etapa de extraer un producto de expresión de una célula terminalmente diferenciada.
- 30 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el producto de expresión es una molécula de ácido nucleico.
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el producto de expresión es una proteína.
- 35 15. Un procedimiento in vitro para producir una línea celular de linfocitos B maduros, comprendiendo dichos procedimiento las etapas de
  - (a) incorporar en un linfocito B maduro una proteína CA-STAT5 en asociación con un agente inactivante;
  - (b) dejar que dichas células se repliquen desconectando dicho agente inactivante, haciendo así activa la CA-STAT5; y
  - 40 (c) mantener dicha línea celular producida.
16. Un procedimiento para inducir la diferenciación terminal en un linfocito B, que comprende
  - (a) obtener una célula de una línea de linfocitos B producida de acuerdo con la reivindicación 15;
  - (b) inducir la diferenciación terminal de dicha célula conectando dicho agente inactivante, haciendo así inactiva la proteína STAT5; y
  - 45 (c) extraer un producto de expresión deseado de la célula terminalmente diferenciada.
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el producto de expresión es una

proteína.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el producto de expresión es una secuencia de ácido nucleico.

19. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que las células son 5 linfocitos B humanos productores de anticuerpos.

20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el producto de expresión es un anticuerpo Ig.

21. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que CA-STAT5 es STAT5a o STAT5b.

10

Figura 1 a

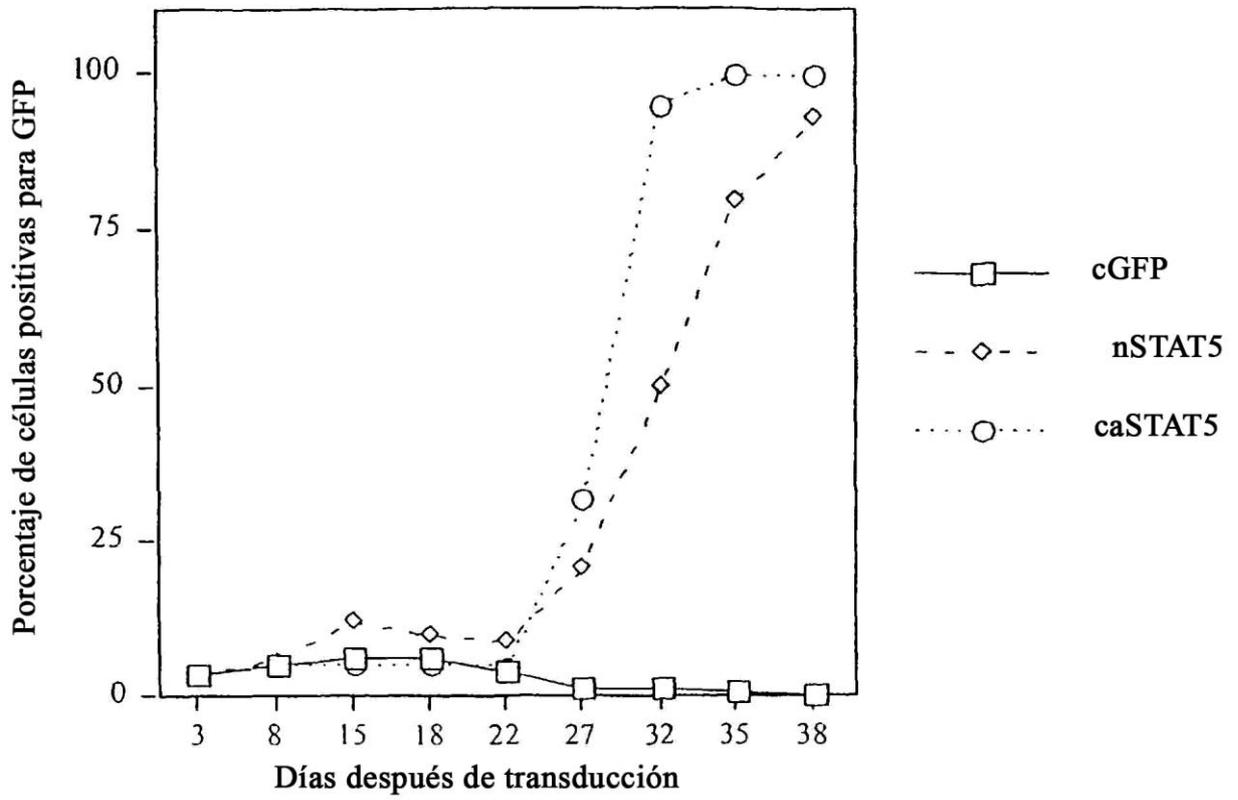


Figura 1b

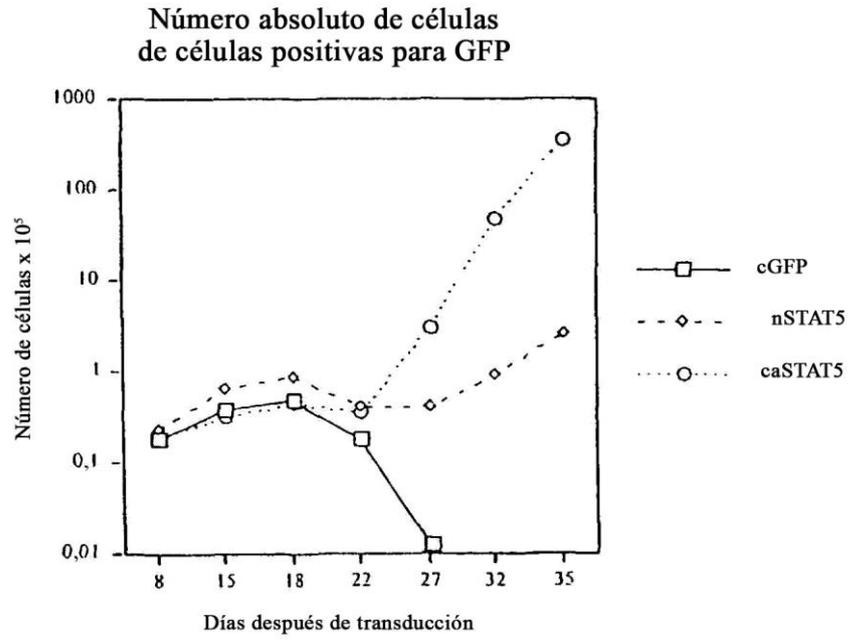


Figura 2

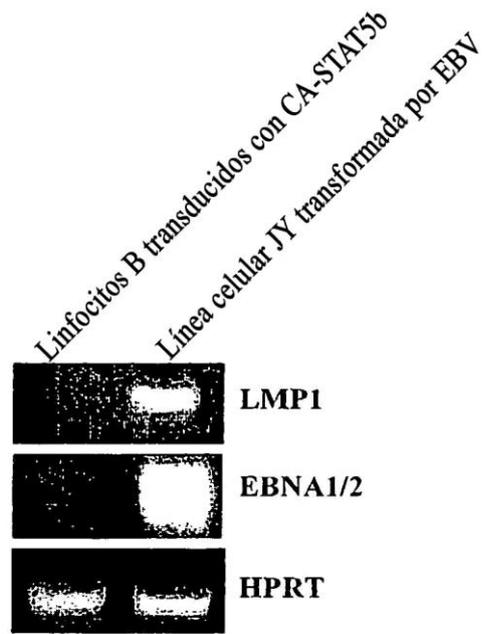


Figura 3

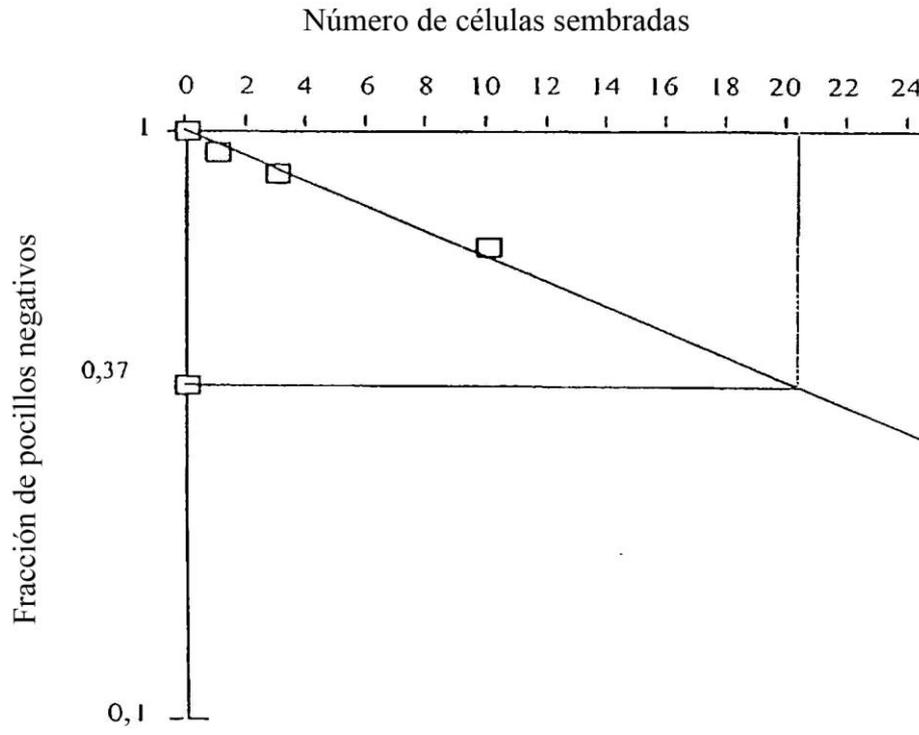


Figura 4

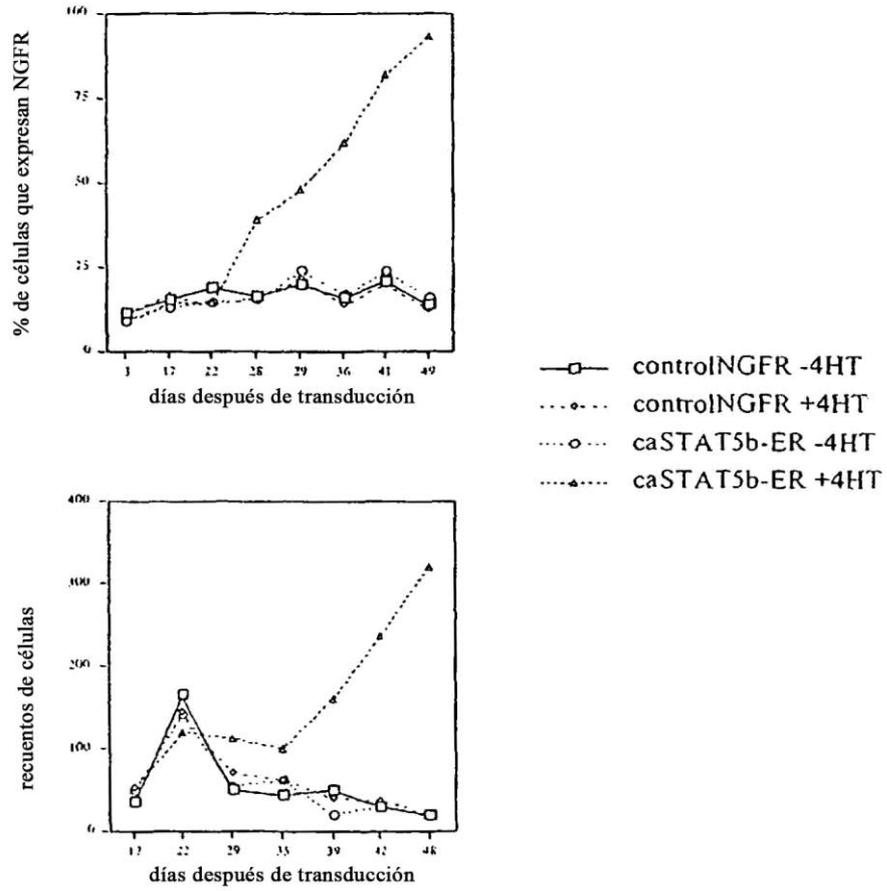


Figura 5

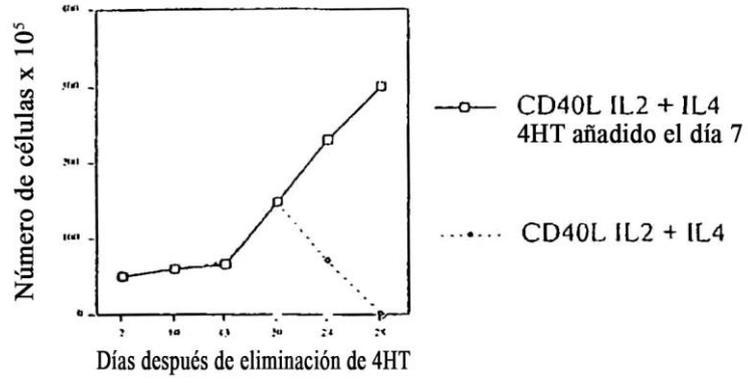


Tabla 1

Porcentaje de células positivas

Antígeno	Inicio del cultivo	Semana 15	Semana 18
CD19	97	85,4	93
CD20	92,5	3	1,68
CD27	2,5	0,5	0,27
CD38	56	43,9	22
CD40	65	96	93
CD80	8	99,7	95

Tabla 2

Producción de IgG (ng/ml)		
	Exp. 1	Exp.2
caSTAT5b	996,6(295)	16,(7,2)
clon 43		40(7,5)
clon 47		15(5,3)