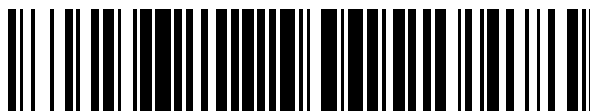


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 930**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04714866 .3**
96 Fecha de presentación: **26.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1597280**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Producción de anticuerpos monoclonales mediante transformación con VEB de células B**

30 Prioridad:
26.02.2003 GB 0304363
06.08.2003 GB 0318431
30.10.2003 GB 0325391
30.10.2003 US 516665 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2012

73 Titular/es:
INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
(100.0%)
VIA VELA 6
6500 BELLINZONA, CH

72 Inventor/es:
LANZAVECCHIA, ANTONIO

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 930 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

Producción de anticuerpos monoclonales mediante transformación con VEB de células B.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar células B de memoria inmortalizadas y a un
 procedimiento para preparar células B de memoria inmortalizadas capaces de producir un anticuerpo monoclonal
 con una especificidad de antígeno deseada. La invención es particularmente útil para preparar anticuerpos
 monoclonales humanos. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para preparar células B de
 memoria humanas inmortalizadas capaces de producir anticuerpos específicos para un agente infeccioso, más
 10 particularmente donde el agente infeccioso es el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS). A
 continuación se describe realizaciones adicionales.

Técnica antecedente

15 El éxito en generar anticuerpos monoclonales murinos depende de la fusión eficaz y selectiva de blastocitos B
 estimulados con antígeno con una línea celular de mieloma murino seguida de la selección de híbridos estables
 productores de anticuerpos (Kohler y Milstein 1975). El documento FR2817875 describe una versión modificada de
 este protocolo donde antes de la inmortalización, se induce a los linfocitos B a diferenciarse mediante un sistema
 activador no específico y una citoquina. Los blastocitos B pueden obtenerse del bazo o ganglios linfáticos. Sin
 embargo, la dificultad en la obtención de blastocitos B estimulados con antígeno y la ausencia de compañeros de
 fusión adecuados ha impedido este enfoque en el sistema humano.

20 Como enfoque alternativo a crear anticuerpos humanos, se ha usado el virus de Epstein Barr (VEB) para
 inmortalizar células B humanas (y de primate) productoras de anticuerpos específicos. El procedimiento de VEB se
 ha descrito en varias publicaciones desde 1977 (Rosen y col. 1977; Steinitz y col. 1977; Steinitz y col. 1980; Kozbor
 y Roder 1981; Lundgren y col. 1983; Rosen y col. 1983; Steinitz y col. 1984; Lanzavecchia 1985). Las células B se
 inmortalizan por infección con VEB y se seleccionan los clones en cultivo que secretan anticuerpos específicos. El
 25 procedimiento no requiere refuerzo antigénico, ya que VEB inmortaliza también células B humanas en reposo. Sin
 embargo, el procedimiento basado en VEB tiene varias limitaciones, concretamente la baja eficacia de la
 inmortalización, la baja eficacia de clonación de las células B inmortalizadas con VEB, la baja tasa de crecimiento y,
 en algunos casos, la baja producción de anticuerpos. El documento US4997764 describe un procedimiento para
 mejorar la tasa de crecimiento de las células inmortalizadas con VEB que comprende transfectar células B
 infectadas con VEB con ADN c-myc activado. Esto confiere a las células la capacidad de crecer en medios semi-
 30 sólidos y de crecer en huéspedes tales como ratas y ratones. El documento WO95/13089 describe el uso de GM-
 CSF e IL-3 para estimular la liberación de anticuerpos por células B. Bornkamm y col. (documento US5798230) han
 superado el problema de la baja producción de anticuerpos inactivando EBNA2. Sin embargo, esto no resuelve el
 problema de la baja eficacia de inmortalización. Para sortear estos problemas algunos autores han realizado un
 enriquecimiento de las células B específicas de antígeno antes de la inmortalización con VEB usando, por ejemplo,
 35 antígenos solubles biotinilados (Casali y col. 1986). Otros propusieron la fusión de células inmortalizadas con VEB
 con mielomas de ratón o heteromielomas humanos-de ratón para explotar la mayor tasa de crecimiento y secreción
 de Ig de los híbridos (Kozbor y col. 1982; Bron y col. 1984; Thompson y col. 1986). Se han hecho reivindicaciones de
 que la eficacia de clonación podría aumentarse por factores de crecimiento derivados de células tales como
 tiorredoxina en una publicación (Ílfersen y col. 1993), pero estos resultados ni se han confirmado ni se han utilizado,
 40 incluso por los mismos autores. En conclusión, aunque el procedimiento de VEB tiene, en principio, algunas
 ventajas, se ha abandonado a causa de la baja eficacia de inmortalización y clonación.

Otra razón por la cual el procedimiento de VEB se ha quedado obsoleto es que han llegado a estar disponibles
 enfoques alternativos para crear anticuerpos monoclonales humanos o tipo humano a través de ingeniería genética.
 45 Éstos incluyen la humanización de anticuerpos murinos, el aislamiento de anticuerpos a partir de bibliotecas de
 diferente complejidad y la producción de hibridomas usando el procedimiento clásico en ratones transgénicos para el
 loci de Ig humana (el "xeno-ratón"). La bibliografía sobre estos enfoques alternativos no se revisa aquí ya que no es
 directamente relevante para la presente invención. Sin embargo, merece la pena considerar algunas limitaciones de
 estos procedimientos. La humanización de anticuerpos monoclonales murinos es un procedimiento laborioso e
 incompleto. Las bibliotecas de anticuerpos aleatorios representan un repertorio no sesgado y por lo tanto pueden
 50 usarse para seleccionar especificidades de anticuerpos contra antígenos altamente conservados, pero conducen a
 anticuerpos de baja afinidad. Las bibliotecas seleccionadas a partir de células sensibilizadas con antígeno se
 enriquecen para una especificidad particular, pero no conservar el par VH-VL original y generalmente conducen a
 anticuerpos que tienen menor afinidad por el antígeno que aquellos presentes en el repertorio original de
 anticuerpos. El impacto de esta tecnología ha sido limitado. En contraste, el xeno-ratón puede inmunizarse de forma
 55 eficaz contra un antígeno de elección (especialmente si éste es un antígeno humano), pero este sistema comparte
 con la tecnología clásica del hibridoma murino la limitación de que los anticuerpos se seleccionan en una especie
 diferente a la humana. Por lo tanto, estos procedimientos no son adecuados para producir anticuerpos con las
 características de los producidos en el transcurso de una respuesta inmune humana fisiológica. Esto es aplicable a
 la respuesta de anticuerpos contra patógenos humanos incluyendo VIH, las cuatro especies de *Plasmodium* que
 60 causan la malaria en seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*), los virus de la hepatitis B y C

humana, el virus del sarampión, virus del Ébola etc. (para una lista exhaustiva véase Fields y col. 1996). También es aplicable a respuestas de anticuerpos contra alérgenos ambientales generados en pacientes alérgicos, contra antígenos tumorales generados en pacientes que albergan tumores y contra auto-antígenos en pacientes con enfermedades autoinmunes.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento de producción eficaz de anticuerpos monoclonales humanos que se hayan seleccionado en el transcurso de la respuesta inmune natural.

Divulgación de la invención

10 Aunque la presente invención se ilustra mediante realizaciones en las que se producen anticuerpos monoclonales humanos, las técnicas descritas en este documento no están limitadas de tal modo. La presente invención puede usarse para cualquier especie para la que se desee producir anticuerpos monoclonales de forma eficaz.

15 La invención se basa en el descubrimiento de que un activador de células B policlonales (tal como secuencias CpG) potencia la eficacia de la immortalización por VEB y de la clonación de células immortalizadas por VEB. Esta eficacia aumentada representa un gran salto que hace que la técnica de VEB sea adecuada para el rápido aislamiento de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales humanos a partir del repertorio de memoria sin necesidad de
 20 inmunización específica o iniciación. Los anticuerpos se seleccionan del entorno inmunocompetente fisiológico estimulado por contacto natural con un patógeno o antígeno. El procedimiento, por lo tanto, es particularmente útil para producir anticuerpos contra determinantes antigénicos que se reconocen específicamente por el sistema inmune humano. Éstos incluyen anticuerpos neutralizantes contra patógenos humanos y anticuerpos contra alérgenos, anticuerpos tumorales, auto-antígenos y alo-antígenos que son parte del repertorio de memoria de un individuo dado. Por lo tanto, no hay necesidad de crear modelos de enfermedad o de inmunización con antígenos purificados. Los anticuerpos producidos también son completamente humanos (incluyendo modificaciones nativas post-traduccionales cuando se expresan en células B) y exploran toda la diversidad generada en el transcurso de una respuesta inmune humana (maduración de afinidad). Por tanto, la invención proporciona, inter alia, un
 25 procedimiento para producir linfocitos B de memoria humanos immortalizados, que comprende la etapa de transformar linfocitos B de memoria humanos usando el virus de Epstein Barr (VEB) en presencia de un activador de células B policlonales. El procedimiento permite una transformación de eficacia extremadamente elevada por primera vez.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para producir un clon de un linfocito B de memoria humano immortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano con una especificidad de antígeno deseada, que comprende las etapas de:

- 35 (i) transformar una población de células que comprende o que consta de linfocitos B de memoria humanos con virus de Epstein Barr (VEB) en presencia de un activador de células B policlonales;
 (ii) explorar el sobrenadante de cultivo para la especificidad de antígeno; y
 (iii) aislar un clon de linfocito B de memoria humano immortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano que tiene la especificidad de antígeno deseada.

40 Los procedimientos de la invención ya se han usado para clonar linfocitos B de memoria humanos con hasta un 100% de eficacia. Se han producido clones de células B transformadas con VEB que producen anticuerpos IgG neutralizantes específicos para el virus del sarampión, las especies de *Plasmodium* que causan la malaria en seres humanos, el toxoide tetánico, *Toxoplasma gondii* y aloantígenos usando este procedimiento. Además, también se han producido clones de células B transformadas con VEB que producen anticuerpos IgG neutralizantes específicos para el coronavirus (CoV) del SRAS. Se apreciará que el procedimiento puede transferirse y usarse para la producción de anticuerpos contra cualquier especificidad que esté presente en el repertorio de memoria humano.

45 La rápida aparición del SRAS en 2002 en China causó cientos de muertes en varios países. El agente causante se desconocía y por tanto no había cura disponible. Desde entonces se ha descubierto que el síndrome está causado por un nuevo tipo de coronavirus (Drosten y col. 2003; Ksiazek y col. 2003) y se requieren procedimientos para detectar este virus y combatir las infecciones causadas por el mismo.

Se describe un procedimiento para producir un clon de linfocitos B de memoria humanos immortalizados capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano específico para el virus del SRAS, que comprende las etapas de:

- 50 (i) transformar una población de células que comprende o que consta de linfocitos B de memoria humanos con virus de Epstein Barr (VEB) en presencia de un activador de células B policlonales,
 (ii) explorar el sobrenadante de cultivo para la especificidad por el virus del SRAS, y
 (iii) aislar un clon de linfocito B de memoria humano immortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano que tiene especificidad por el virus de SRAS.

55 En la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo que tiene especificidad por el virus del SRAS" significa que una molécula de anticuerpo se une al coronavirus que es el agente causante del SRAS con una mayor afinidad en comparación con su afinidad de unión por otros virus.

En líneas generales, la invención también proporciona un procedimiento para producir linfocitos B de memoria humanos inmortalizados, que comprende una etapa de transformar una población de linfocitos B de memoria humanos, donde el procedimiento transforma $\geq n\%$ de los linfocitos B de memoria humanos en la población. El valor de n se selecciona entre 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100. Después de producir las células inmortalizadas, entonces pueden explorarse para seleccionar células que produzcan anticuerpos con una especificidad deseada. Las células seleccionadas después pueden usarse para la producción de anticuerpos monoclonales. Este procedimiento preferiblemente no implica la fusión celular de linfocitos B de memoria con otras células.

Activadores policlonales

10 En la presente memoria descriptiva, el término "activador policlonal" significa una molécula o compuesto o una combinación de los mismos que activa los linfocitos B independientemente de su especificidad antigénica.

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato expresados en una diversidad de células, incluyendo células dendríticas y células B (Medzhitov y Janeway 2000, 2002). Los agonistas de TLR incluyen productos microbianos y compuestos sintéticos. Los activadores policlonales preferidos son agonistas de los receptores tipo Toll que se expresan en células B de memoria, tales como TLR-7, TLR-9 y TLR-10 (Bernasconi y col. 2003). Dichas moléculas pueden ser de origen microbiano o celular o sintéticas.

Oligonucleótidos de ADN no metilado (CpG) son agonistas de TLR-9. Estimulan la maduración de células dendríticas y activan la proliferación de células B y la diferenciación de forma policlonal, es decir independientemente de la especificidad del anticuerpo (Krieg y col. 1995; Krieg 2002). El efecto biológico de CpG depende de las secuencias específicas y las modificaciones químicas (Krieg 2002). Los oligonucleótidos CpG pueden usarse como activadores policlonales, y ejemplos de activadores adecuados son CpG tales como CpG 2006 (5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'; Hartmann y col. 2000) y otras secuencias oligonucleotídicas que activan TLR-9. Por "CpG" se entiende secuencias de oligonucleótidos de ADN no metilado. Más particularmente, el término "CpG" incluye moléculas de ADN monocatenario de entre 5 y 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10-80, 20-70, 30-60 nucleótidos) que incluyen uno o más casos (por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10 o más) de la secuencia dinucleotídica CG en que la C en el o los dinucleótidos está sin metilar.

Los compuestos de imidazoquinolina, tales como R-848 (resiquimod), activan TLR-7 y TLR-8 y estimulan la maduración de células dendríticas (Hemmi y col. 2002). Dichos compuestos pueden usarse como activadores policlonales con la invención, por ejemplo, R-848 (y sus análogos) y otros compuestos sintéticos que activan TLR-7 y TLR-8, incluyendo, aunque sin limitación: imiquimod, loxoribina, y análogos de guanosina (por ejemplo, 7-tia-8-oxoguanosina y 7-desazaguanosina).

Otros activadores policlonales incluyen otros agonistas de TLR y de otros receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se expresan en células B de memoria, incluyendo anticuerpos monoclonales específicos para TLR.

Los activadores policlonales también pueden incluir PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), tales como lipopolisacárido (LPS), peptidoglucanos, flagelinas, zimosán y otros componentes de pared celular encontrados en patógenos. Otros activadores policlonales disponibles incluyen loxoribina, *Acholeplasma laidlawii* inactivada por calor, *Listeria monocytogenes* inactivada por calor, ácidos lipoteicoicos, lipopéptidos tripalmitoilados (por ejemplo, Pam₃CSK4), ARN monocatenario (Diebold y col. 2004; Heil y col. 2004), ARN bicatenario, poli(I:C), ADN bacterianos, etc. Puede encontrarse una lista detallada de agonistas de TLR en Takeda y col. (2003). Algunos activadores no son preferidos para su uso con células B humanas, por ejemplo, LPS.

En un aspecto particularmente preferido, se usa CpG 2006 como activador policlonal.

Los proveedores comerciales de activadores policlonales adecuados incluyen *Invivogen*.

Recientemente se ha demostrado que las células B de memoria humanas se estimulan selectivamente por CpG (Bernasconi y col. 2002), y que varios TLR se expresan selectivamente en células B de memoria humanas pero no en células B vírgenes (Bernasconi y col. 2003).

Transformación de células B

En procedimientos de la invención, las células pueden transformarse con VEB en presencia de un activador de células B policlonales. La transformación con VEB es una técnica convencional y puede adaptarse fácilmente para incluir activadores de células B policlonales.

50 Pueden añadirse estimuladores adicionales del crecimiento celular y la diferenciación durante la etapa de transformación para potenciar adicionalmente la eficacia. Estos estimuladores pueden ser citoquinas tales como IL-2 e IL-15. En un aspecto particularmente preferido, se añade IL-2 durante la etapa de inmortalización para mejorar adicionalmente la eficacia de la inmortalización, pero su uso no es esencial.

Las células B de memoria a transformar pueden provenir de diversas fuentes (por ejemplo, de sangre completa, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), de cultivo de sangre, de médula ósea, de órganos, etc.), y los procedimientos adecuados para obtener células B humanas son bien conocidos en la técnica. Las muestras pueden incluir células que no son células B de memoria, por ejemplo, otras células sanguíneas. Puede seleccionarse una subpoblación específica de linfocitos B de memoria humanos que muestre una especificidad de antígeno deseada antes de la etapa de transformación usando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, la subpoblación de linfocitos B de memoria humanos puede tener especificidad por el virus del SRAS, por ejemplo, las células B pueden obtenerse de un paciente que esté padeciendo o se haya recuperado del SRAS. En otra realización, las células B pueden obtenerse de sujetos con enfermedad de Alzheimer e incluyen células B con especificidad por β -amiloide (por ejemplo, Hock y col. (2002) *Nature Medicine* 8:1270-75; Mattson y Chan (2003) *Science* 301:1847-9; etc.).

Exploración y aislamiento de células B

Las células B transformadas se exploran para aquellas que tengan la especificidad de antígeno deseada, y después pueden producirse clones de células B individuales a partir de las células positivas.

La etapa de exploración puede realizarse por ELISA, por tinción de tejidos o células (incluyendo células transfectadas), un ensayo de neutralización o uno de varios procedimientos diferentes conocidos en la técnica para identificar la especificidad de antígeno deseada. El ensayo puede seleccionar en base al simple reconocimiento de antígeno, o puede seleccionar adicionalmente en base a una función deseada, por ejemplo, para seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de solamente anticuerpos que se unan a antígeno, para seleccionar anticuerpos que puedan cambiar las características de las células marcadas como diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir sobre otras células, su respuesta a la influencia por otras células o por otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas puede realizarse usando dilución limitante, micromanipulación, deposición de células individuales por clasificación celular u otro procedimiento conocido en la técnica. Preferiblemente la clonación se realiza usando dilución limitante.

Los procedimientos de la invención producen células B inmortalizadas que producen anticuerpos que tienen una especificidad de antígeno deseada. La invención, por tanto, proporciona un clon de célula B inmortalizada que se puede obtener o que se obtiene por los procedimientos de la invención. Estas células B pueden usarse de diversos modos, por ejemplo, como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para su suministro a pacientes para terapia celular, para investigación, etc.

Se describe una composición que comprende linfocitos B de memoria inmortalizados, en la que los linfocitos producen anticuerpos, y en la que los anticuerpos se producen a $\geq 10^N$ ng por clon por día. También se describe una composición que comprende clones de un linfocito B de memoria inmortalizado, en la que los clones producen un anticuerpo monoclonal de interés, y en la que el anticuerpo se produce a $\geq 10^N$ ng por clon por día. El valor de N se selecciona entre -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3 ó 4.

Anticuerpos

Se describe un anticuerpo monoclonal que se puede obtener o se obtiene de clones de células B usados en el procedimiento de la invención, y fragmentos de estos anticuerpos monoclonales, particularmente fragmentos que retienen la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos.

En general, estos anticuerpos pertenecen a dos categorías: reconocen auto-antígenos o no auto-antígenos. Los anticuerpos que reconocen auto-antígenos pueden usarse para tratar enfermedades causadas por expresión génica aberrante, incluyendo cánceres, y por procesamiento aberrante de proteínas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos que reconocen no auto-antígenos pueden usarse para tratar enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones parasitarias, víricas y bacterianas. La invención puede proporcionar ventajosamente anticuerpos humanos que reconocen antígenos de interés donde no ha sido previamente posible.

Los procedimientos de la invención producen anticuerpos con las características de los producidos en el trascurso de una respuesta inmune humana fisiológica, es decir, especificidades de anticuerpo que pueden seleccionarse solamente por el sistema inmune humano. Esto es aplicable a la respuesta contra patógenos humanos incluyendo el VIH, las especies de *Plasmodium* que causan la malaria humana, los virus de la hepatitis B y C humana, el virus del sarampión, el virus del Ébola, el virus del SRAS, poxvirus, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Bornaviridae*, *Reoviridae* (incluyendo rotavirus y orbivirus), *Retroviridae* (incluyendo VLHT-I, VLHT-II, VIH-1, VIH-2), *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae*, *Herpesviridae* (incluyendo los virus del herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus varicela-zóster, los herpesvirus 6A, 6B y 7), *Poxviridae*, *Hepadnaviridae*, etc. (para una lista exhaustiva véase Fields y col. 1996). También es aplicable a respuestas de anticuerpos contra alérgenos ambientales generados en pacientes alérgicos, contra proteínas priones, contra antígenos tumorales generados en pacientes que albergan tumores y contra auto-antígenos en pacientes con enfermedades autoinmunes, contra

proteínas amiloides, etc. Estos anticuerpos pueden usarse como agentes profilácticos o terapéuticos tras su formulación apropiada o como herramienta de diagnóstico.

5 En relación a cualquier patógeno particular, un "anticuerpo neutralizante" es uno que puede neutralizar la capacidad de ese patógeno de iniciar y/o perpetuar una infección en un huésped. Se describe un anticuerpo humano monoclonal neutralizante, donde el anticuerpo reconoce un antígeno de un patógeno seleccionado entre: el virus de la inmunodeficiencia humana; el virus de la hepatitis A; el virus de la hepatitis B; el virus de la hepatitis C; el virus del herpes simple tipo I o tipo 2; el coronavirus del SRAS; el virus del sarampión; el virus de las paperas; el virus de la rubéola; el virus de la rabia; el virus del Ébola; el virus de la influenza; el virus del papiloma; el virus vaccinia; el virus varicela-zóster; el virus de la viruela; el virus de la polio; el rinovirus; el virus sincitial respiratorio; *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. malariae*; *P. ovale*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Clostridium tetani*; *Clostridium botulinum*; *Bordetella pertussis*; *Haemophilus influenzae*; *Neisseria meningitidis*, serogrupo A, B, C, W135 y/o Y; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus pyogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus anthracis*; *Moraxella catarrhalis*; *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Yersinia pestis*; *Francisella tularensis*; especies de *Salmonella*; *Vibrio cholerae*; *E. coli* tóxica; un retrovirus endógeno humano; etc.

15 También se describen anticuerpos monoclonales humanos que reconocen proteínas expresadas específicamente en tumores, en células cardiovascular enfermas, durante respuestas inflamatorias, en trastornos neurológicos (incluyendo enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, proteínas β-amiloides), en encefalopatías, etc. También se describen anticuerpos monoclonales humanos que reconocen sustancias narcóticas tales como cocaína, heroína, benzoilecgonina, anfetaminas, etc.

20 Los antígenos específicos que pueden reconocerse por dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitación: TNF-α, proteína β-amiloides, la proteína espiga del coronavirus SRAS, la proteína prión PrP, complemento C5, CBL, CD147, IL-8, glucoproteína gp120 de VIH, VLA-4, CD11a, CD18, VEGF, CD40L, moléculas de adhesión celular tales como ICAM y VCAM, CD80, integrinas, TPL2, Her2, etc.

25 También se describe un anticuerpo que tiene dos cadenas polipeptídicas, en el que una o ambas cadenas polipeptídicas tienen una secuencia VDJ humana.

Los anticuerpos monoclonales producidos por los procedimientos de la invención pueden purificarse adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos procedimientos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Las técnicas para la purificación de anticuerpos monoclonales, incluyendo técnicas para producir anticuerpos de calidad farmacéutica, son bien conocidas en la técnica.

30 Pueden obtenerse fragmentos de los anticuerpos monoclonales a partir de los anticuerpos monoclonales producidos de este modo por procedimientos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o por escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Los "fragmentos" de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv. También se describen fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) obtenidos de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal.

35 También se describe un anticuerpo humano monoclonal con actividad neutralizante, donde el anticuerpo puede neutralizar a una concentración de 10⁻⁹ M o inferior (por ejemplo, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M o inferior).

40 Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles en la identificación y purificación de los polipéptidos individuales u otros antígenos contra los que están dirigidos. Los anticuerpos monoclonales descritos tienen utilidad adicional porque pueden emplearse como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). En estas aplicaciones, los anticuerpos pueden marcarse con un reactivo analíticamente detectable tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos monoclonales producidos por el procedimiento anterior también puede usarse para la identificación y caracterización molecular (mapeo de epítopes) de antígenos reconocidos por individuos protegidos en patógenos complejos tales como plasmodios, el aislamiento de anticuerpos protectores de reactividad cruzada en el caso de patógenos altamente variables tales como los encontrados en el VIH y para la detección de patógenos y la determinación de su variabilidad.

45 Los anticuerpos pueden acoplarse a un fármaco para su suministro a un sitio de tratamiento o acoplarse a un marcador detectable para facilitar la formación de imágenes de un sitio que comprende células de interés, tales como células cancerosas. Los procedimientos para acoplar anticuerpos a fármacos y marcadores detectables son bien conocidos en la técnica, como los procedimientos para la formación de imágenes usando marcadores detectables.

Los anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido.

50 Los anticuerpos pueden proporcionarse en forma purificada. Típicamente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos del 90% (en peso), habitualmente menos del 60% y más habitualmente menos del 50% de la composición está compuesta de otros polipéptidos.

Los anticuerpos pueden ser inmunogénicos en huéspedes no humanos (o heterólogos), por ejemplo, en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un idiotipo que es inmunogénico en huéspedes no humanos, pero no en un huésped humano. Los anticuerpos para su uso en seres humanos incluyen aquellos que no pueden obtenerse de huéspedes tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos no primates, etc. y no pueden obtenerse por humanización o a partir de xeno-ratones.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgG, IgM, es decir, una cadena pesada α , y μ), pero generalmente serán IgG. Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden ser de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos pueden tener una cadena ligera κ o λ .

También se describe una célula de linfocito B de memoria inmortalizado (particularmente una célula humana), donde la célula se infecta con VEB y codifica un anticuerpo de la invención.

Composiciones farmacéuticas

El uso de anticuerpos monoclonales como ingrediente activo de composiciones farmacéuticas ahora está extendido, incluyendo los productos Herceptin™ (trastuzumab), Rituxan™, Campath™, Remicade™, ReoPro™, Mylotarg™, Zevalin™, Omalizumab, Synagis™ (Palivizumab), Zenapax™ (daclizumab), etc. Éstas incluyen anticuerpos que reconocen auto-antígenos humanos (por ejemplo, Herceptin™ reconoce el marcador Her2) y anticuerpos que reconocen antígenos patogénicos (por ejemplo, Synagis™ reconoce un antígeno del virus sincitial respiratorio).

Por tanto, se describe una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos monoclonales y/o las células B transformadas. Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, en dichas composiciones. Dichos vehículos posibilitan que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptarse la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizadores y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones pueden administrarse directamente al sujeto. Se prefiere que las composiciones estén adaptadas para su administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquiera de varias vías incluyendo, aunque sin limitación, vía oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, documento WO98/20734), tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipopulverizaciones para administrar las composiciones farmacéuticas. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse en forma de inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección.

El suministro directo de las composiciones generalmente se conseguirá por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o suministrada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en el interior de una lesión. El tratamiento posológico puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas conocidas basadas en anticuerpos proporcionan directrices que se refieren a la frecuencia de administración, por ejemplo, si una composición farmacéutica debe suministrarse diariamente, semanalmente, mensualmente, etc. La frecuencia y dosificación también pueden depender de la gravedad de los síntomas.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición ser una molécula de anticuerpo. Por tanto, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición tiene que administrarse por una vía usando el tracto gastrointestinal, la composición tendrá que contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación

pero que liberen el anticuerpo una vez se haya absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Está disponible un análisis minucioso de los vehículos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991) y en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN: 0683306472.

- 5 Las composiciones farmacéuticas generalmente tienen un pH entre 5,5 y 8,5, preferiblemente entre 6 y 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos. Las composiciones farmacéuticas se suministran preferiblemente en recipientes sellados herméticamente.

- 10 Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos y/o una o más células B transformadas, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar, o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen reducción en los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para cualquier sujeto particular dependerá de su tamaño y salud, la naturaleza y grado de la afección, y los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para su administración. La cantidad eficaz para una situación dada se determina por experimentación rutinaria y entra dentro del criterio del médico. Para propósitos de la presente invención, una dosis eficaz generalmente será de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones en el individuo al que se administra. Las composiciones farmacéuticas conocidas basadas en anticuerpos proporcionan directrices a este respecto, por ejemplo, Herceptin™ se administra mediante infusión intravenosa de una solución de 21 mg/ml, con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; Rituxan™ se administra semanalmente a 375 mg/m²; etc.

Las composiciones pueden incluir más de un anticuerpo (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.), particularmente cuando dichos anticuerpos se unen a diferentes antígenos (o a diferentes epítopes en el mismo antígeno) para proporcionar un efecto terapéutico sinérgico.

- 25 Los anticuerpos pueden administrarse (combinados o por separado) con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, con compuestos quimioterapéuticos, con radioterapia, etc.

En composiciones que incluyen anticuerpos, los anticuerpos preferiblemente componente al menos el 50% en peso (por ejemplo, el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más) de las proteínas totales en la composición. Los anticuerpos están, por tanto, en forma purificada.

- 30 Se describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende las etapas de:

- (i) preparar un anticuerpo monoclonal y (ii) mezclar el anticuerpo purificado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 35 También se describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo de una célula B transformada. Por tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal y preparar después la composición farmacéutica, pueden realizarse en momentos muy diferentes por personas diferentes en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

- 40 Como alternativa al suministro de anticuerpos monoclonales o células B para propósitos terapéuticos, es posible suministrar a un sujeto ácido nucleico (típicamente ADN) que codifique el anticuerpo monoclonal (o fragmento activo del mismo) de interés, de modo que el ácido nucleico pueda expresarse en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. La terapia génica y los vectores de suministro de ácido nucleico adecuados son conocidos en la técnica.

Tratamientos médicos y usos

- 45 Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos pueden usarse para el tratamiento de enfermedades, para la prevención de enfermedades o para el diagnóstico de enfermedades. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales se usan para la prevención o tratamiento del SRAS o para el diagnóstico del SRAS. Los procedimientos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Los procedimientos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo.

- 50 Se describe una composición para su uso como medicamento, el uso de un anticuerpo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente y/o el diagnóstico en un paciente, y un procedimiento para tratar a un sujeto y/o para realizar el diagnóstico en un sujeto, que comprende la etapa de administrarle una composición. El sujeto es preferiblemente un ser humano. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición. El tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis, y puede ser para tratar enfermedades

infecciosas, cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, etc.

Los anticuerpos pueden usarse en inmunización pasiva.

5 Las composiciones generalmente se administrarán directamente a un paciente. El suministro directo puede conseguirse por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración a la mucosa.

10 Las composiciones pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse en forma de inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección (por ejemplo, una composición liofilizada, como Synagis™ y Herceptin™, para su reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, en forma de una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, en forma de un comprimido o cápsula, en forma de una pulverización, o en forma de un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, en forma de gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de tal modo que se reconstituya una composición combinada justo antes de su administración a un paciente. Por ejemplo, puede proporcionarse un anticuerpo liofilizado en forma de kit con agua estéril o un tampón estéril.

20 También pueden usarse anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se describe, en un kit para el diagnóstico de una enfermedad tumoral, autoinmune o alérgica.

Expresión recombinante

25 Los linfocitos B de memoria inmortalizados producidos usando el procedimiento de la invención también pueden usarse como fuente de ácido nucleico para la clonación de genes de anticuerpos para la posterior expresión recombinante. La expresión a partir de fuentes recombinantes es más habitual para propósitos farmacéuticos que la expresión a partir de células B o hibridomas, por ejemplo, por razones de estabilidad, reproducibilidad, facilidad de cultivo, etc.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de:

30 (i) preparar un clon de célula B inmortalizada como se ha descrito anteriormente; (ii) obtener uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de cadena pesada y/o ligera) a partir del clon de célula B que codifica el anticuerpo de interés; y (iii) insertar el ácido nucleico en un huésped de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese huésped.

35 Asimismo, la invención proporciona un procedimiento para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de:

(i) preparar un clon de célula B inmortalizada como se ha descrito anteriormente; (ii) secuenciar uno o más ácidos nucleicos a partir del clon de célula B que codifica el anticuerpo de interés; y (iii) usar la información de secuencia de la etapa (ii) para preparar uno o más ácidos nucleicos para insertarlos en un huésped de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese huésped.

40 Se describe un procedimiento para preparar una célula recombinante, que comprende la etapa de transformar una célula huésped con uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal de interés, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que se obtuvieron de un clon de célula B inmortalizada de la invención. Por tanto, los procedimientos para preparar primero el o los ácidos nucleicos y después usarlos para transformar una célula huésped, pueden realizarse en diferentes momentos por diferentes personas en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

45 Estas células recombinantes de la invención después pueden usarse para propósitos de expresión y cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos para producción farmacéutica a gran escala. También pueden usarse como ingrediente activo de una composición farmacéutica. Puede usarse cualquier técnica de cultivo adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, cultivo estático, cultivo en frasco rotatorio, fluido ascítico, cartucho de biorreactor tipo fibra hueca, minifermentador modular, tanque agitado, cultivo en microportadores, perfusión con núcleo cerámico, etc.

50 Los procedimientos para obtener y secuenciar los genes de inmunoglobulina a partir de células B son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase el capítulo 4 de Kuby Immunology (4ª edición, 2000; ASIN: 0716733315).

5 El huésped de expresión es preferiblemente una célula eucariota, incluyendo células de levadura y animales, particularmente células de mamífero (por ejemplo, células CHO, células humanas tales como PERC6 [Crucell; Jones y col. Biotechnol Prog 2003,19(1):163-8] o células HKB-11 [Bayer; Cho y col. Cytotechnology 2001, 37:23-30; Cho y col. Biotechnol Prog 2003,19:229-32], células de mieloma [patentes de Estados Unidos 5.807.715 y 6.300.104], etc.), así como células vegetales. Los huéspedes de expresión preferidos pueden glucosilar el anticuerpo de la invención, particularmente con estructuras de carbohidrato que no son en sí mismas inmunogénicas en seres humanos. Se prefieren huéspedes de expresión que pueden crecer en medios sin suero. Se prefieren huéspedes de expresión que pueden crecer en cultivo sin presencia de productos derivados de animales.

El huésped de expresión puede cultivarse para dar una línea celular.

10 La invención proporciona un procedimiento para preparar una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes de cadena pesada y ligera) que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada de acuerdo con la invención; (ii) obtener del clon de célula B el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. La invención también proporciona un procedimiento para obtener una secuencia de
15 ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada de acuerdo con la invención; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de célula B que codifica el anticuerpo de interés.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una o más moléculas de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende la etapa de obtener el ácido nucleico de un clon de célula B que se obtuvo de una célula B transformada de la invención. Por tanto, los procedimientos para obtener primero el clon de
20 célula B y después preparar el o los ácidos nucleicos a partir del mismo, pueden realizarse en momentos muy diferentes por personas diferentes en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

La invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo (por ejemplo, para uso farmacéutico), que comprende las etapas de: (i) transformar una población de linfocitos B de memoria humanos y seleccionar una célula B transformada que produce un anticuerpo con una especificidad deseada, como se ha descrito
25 anteriormente; (ii) obtener y/o secuenciar uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de cadena pesada y ligera) a partir de la célula B seleccionada del anticuerpo de interés; (iii) insertar el o los ácidos nucleicos en o usar el o los ácidos nucleicos para preparar un huésped de expresión que pueda expresar el anticuerpo de interés; (iv) cultivar o subcultivar el huésped de expresión en condiciones en que se expresa el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (v) purificar el anticuerpo de interés.

30 También se describe un procedimiento para preparar un anticuerpo, que comprende las etapas de: cultivar o subcultivar una población de células huésped de expresión en condiciones en que se expresa el anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés, en el que dicha población de células huésped de expresión se ha preparado por (i) proporcionando uno o más ácidos nucleicos que codifican en una célula B seleccionada el anticuerpo de interés que se produce por una población de linfocitos B de memoria preparada como
35 se ha descrito anteriormente, (ii) insertando el o los ácidos nucleicos en un huésped de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, y (iii) cultivando o subcultivando los huéspedes de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos insertados para producir dicha población de células huésped de expresión. Por tanto, los procedimientos para preparar primero el huésped de expresión recombinante y cultivarlo después para expresar el anticuerpo, pueden realizarse en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por
40 ejemplo, en diferentes países).

También se describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo de un huésped de expresión de la invención. Por tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, expresarlo y/o purificarlo) y mezclarlo
45 después con el vehículo o vehículos farmacéuticos, pueden realizarse en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Partiendo con una célula B transformada de la invención, pueden realizarse diversas etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación de ácido nucleico etc. para perpetuar el anticuerpo expresado por la célula B transformada, con optimización opcional en cada etapa. En una realización preferida, los procedimientos anteriores comprenden adicionalmente técnicas de optimización (por ejemplo, maduración u optimización de la afinidad) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo.

50 En todos estos procedimientos, el ácido nucleico usado en el huésped de expresión puede manipularse entre las etapas (ii) y (iii) para insertar, delecionar o corregir ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios a partir de dicha manipulación incluyen, aunque sin limitación, cambios para introducir sitios de restricción, para corregir el uso de codones, para añadir u optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones de aminoácidos, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) delecciones de aminoácidos y/o una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones puntuales pueden

modificar funciones efectoras, la afinidad de unión al antígeno, las modificaciones post-traduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo, marcadores) o pueden introducir marcas (por ejemplo, para propósitos de purificación). Las mutaciones pueden introducirse en sitios específicos o pueden introducirse aleatoriamente, seguidas de selección (por ejemplo, evolución molecular).

5 **SRAS**

Los anticuerpos específicos para el virus del SRAS pueden ser particularmente útiles para la profilaxis y pueden administrarse a profesionales sanitarios u otras personas que puedan entrar en contacto con pacientes infectados por el virus de SRAS. Dicha seroterapia pasiva puede ofrecer una cura inmediata de los individuos infectados así como una contención a través de la protección de los contactos y el personal médico. No hay sueros humanos que contengan anticuerpos contra el virus del SRAS disponibles en cantidades suficientes, por lo tanto, el procedimiento de la invención proporciona un modo ideal para producir anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes. Dichos anticuerpos pueden usarse para desarrollar una seroterapia pasiva contra éste y otros patógenos.

Por lo tanto también se describe un procedimiento para prevenir la transmisión del virus del SRAS que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el virus del SRAS. Por lo tanto deben mantener soluciones madre de anticuerpo específico para el virus del SRAS de modo que estén disponibles para su uso inmediato en cualquier brote posterior de SRAS.

Especies no humanas

La invención se ha descrito anteriormente en relación a anticuerpos humanos preparados a partir de células B humanas. Se apreciará que la invención no está técnicamente restringida al uso con células humanas, y puede usarse con cualquier organismo de interés, por ejemplo, para proporcionar anticuerpos para uso veterinario terapéutico o de diagnóstico. Los organismos con células B que pueden transformarse por los procedimientos de la invención incluyen primates (monos, simios, gorilas, gibones, lémures, chimpancés, babuinos, orangutanes, macacos, etc.), vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, camellos, tiburones, peces, etc.

General

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consta de", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados del ELISA usando células Vero infectadas con el virus del SRAS lisadas en SDS al 3% como antígeno. Se muestran los valores de DO del suero (dilución 1/5000), sobrenadantes de cultivos policlonales y de clones de células B independientes (dilución 1/2).

La Figura 2 muestra el título neutralizante de anticuerpos específicos para el virus del SRAS. De izquierda a derecha: título de neutralización (ensayo de células Vero) de suero de convalecientes; sobrenadantes de cultivos policlonales; clones positivos aislados del cultivo con los títulos neutralizantes más elevados.

La Figura 3 muestra el análisis clonal de la respuesta de anticuerpos humanos contra la proteína espiga del virus del SRAS. Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para su capacidad de teñir células BHK transfectadas con el ARNm de la proteína espiga del virus del SRAS (aislado Frankfurt) y para su capacidad de neutralizar la misma cepa de virus del SRAS. La Figura 3A muestra la correlación entre el título neutralizante y la tinción de la proteína espiga por el sobrenadante de cultivo sin diluir. La Figura 3B muestra la tinción de células BHK transfectadas con la proteína espiga por diluciones en serie de los sobrenadantes de once cultivos neutralizantes, mostrando los símbolos rellenos la dilución máxima en que se observó neutralización completa.

La Figura 4 muestra la caracterización del anticuerpo S3.1 neutralizante de SRAS. Tinción de células BHK transfectadas con la proteína espiga por S3.1 purificado (círculos) y suero de convalecientes de 6 meses (cuadrados). Los símbolos rellenos indican la dilución máxima en que se observó neutralización completa.

La Figura 5 muestra la inmunomicroscopía electrónica del coronavirus del SRAS en presencia de anticuerpo S3.1.

La Figura 6 es un resumen de un procedimiento de la invención, desde el ser humano hasta el anticuerpo monoclonal.

Modos para realizar la invención

La presente invención permite la clonación de linfocitos B de memoria humanos con una eficacia muy elevada y consigue esto por la combinación de dos estímulos, concretamente: VEB, que inmortaliza las células B humanas con baja eficacia y un activador de células B policlonales que potencia la eficacia de la inmortalización con VEB.

5 **Ejemplo 1: Clonación de células B**

Se aislaron células B de memoria humanas (CD19⁺ CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻) de donantes sanos por clasificación celular usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Se sembraron diferentes cantidades de células en cultivos duplicados en microplacas de 96 pocillos en presencia de células mononucleares irradiadas (5x10⁵/ml) y VEB (sobrenadante de células B95-8) solo o VEB en combinación con CpG 2006 (2,5 µg/ml) e IL-2 recombinante (1000 U/ml). Después de 15 días, se valoró el porcentaje de cultivos que contenían células en crecimiento. Las frecuencias se determinaron por ensayos de dilución limitante. Los cultivos se valoraron para las células en crecimiento. La eficacia de clonación usando cuatro fuentes diferentes de células B fue la siguiente:

Fuente de células B	Eficacia de clonación	
	VEB	VEB + CpG + IL-2
Exp 1 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	1 en 200	1 en 1
Exp 2 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	1 en 120	1 en 1,5
Exp 3 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	1 en 60	1 en 1
Exp 4 (CD19 ⁺ CD27 ⁺)	1 en 90	1 en 1,6

No se observó crecimiento en ausencia de VEB.

15 Por tanto, los procedimientos de la invención permiten clonar casi cualquier célula B de memoria humana (eficacia cercana al 100%). El procedimiento también es adecuado para subclonación.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpos con una especificidad deseada

En un experimento adicional, se demostró que la inmortalización puede usarse para explotar la memoria inmunológica para producir anticuerpos monoclonales humanos de la especificidad deseada.

20 Se aislaron células mononucleares de 20 ml de sangre periférica obtenida de un donante de sangre sano. Se aislaron células B de memoria humanas CD19⁺CD27⁺IgG⁺ por clasificación celular y se sembraron a 10 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en presencia de VEB, CpG 2006 (2,5 µg/ml), IL-2 recombinante (1000 U/ml) y células mononucleares irradiadas (5x10⁵/ml). Sembrar solamente 10 células por pocillo ayuda a aumentar la eficacia de clonación. Después de 15 días todos los cultivos contenían células en crecimiento. Se recogió una muestra de sobrenadante y se ensayó en ELISA para los anticuerpos IgG totales y para IgG específica para *Toxoplasma gondii*, toxoide tetánico y virus del sarampión. Los sobrenadantes también se ensayaron en un ensayo de neutralización del virus del sarampión usando células Vero como dianas.

30 Algunos de los cultivos positivos identificados se subclonaron por dilución limitante para aislar clones específicos que producen el anticuerpo monoclonal deseado. Los cultivos se subclonaron a 0,5 células/pocillo en presencia de CpG 2006 (2,5 µg/ml), IL-2 (1000 U/ml) y PBMC irradiadas (5x10⁵/ml).

Anticuerpo (procedimiento de detección)	Cultivos positivos [#]	Clones específicos aislados/intentos realizados*
IgG (ELISA)	180/180	
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (ELISA)	23/180	5/6
Anti-toxoide tetánico (ELISA)	19/180	5/6
Anti-virus del sarampión (ELISA)	36/180	7/9
Anti-virus del sarampión (neutralización)	7/180	4/4

(continuación)

Anticuerpo (procedimiento de detección)	Cultivos positivos [#]	Clones específicos aislados/intentos realizados*
<p>[#]Para ELISA, número de cultivos con DO >0,8 en un ensayo con fondo <0,2; para ensayo de neutralización, número con protección completa contra el efecto citolítico del virus del sarampión.</p> <p>*Número de casos en que pudo aislarse al menos un clon específico de antígeno, relativo al número de cultivos originales que se clonaron. La eficacia de clonación varió del 50 al 100%. Por tanto pudieron aislarse clones de células B transformadas con VEB que producen anticuerpos IgG contra el virus del sarampión, toxoide tetánico y <i>Toxoplasma gondii</i>, demostrando que pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos con múltiples especificidades de memoria a partir de una pequeña muestra de sangre periférica humana.</p>		

Ejemplo 3: Células B de memoria inmortalizadas que expresan anticuerpos específicos para el coronavirus del SRAS

- 5 Se obtuvieron muestras de sangre de dos pacientes con historia clínica de SRAS. Ambos pacientes tenían anticuerpos séricos anti-SRAS que se detectaron en dos ensayos: (i) un ensayo de neutralización que detecta anticuerpos neutralizantes dirigidos contra proteínas de superficie del virus del SRAS, probablemente la proteína espiga y (ii) un ensayo ELISA, que detecta anticuerpos que se unen a cualquier proteína desnaturalizada del virus del SRAS.
- 10 Para el ensayo de neutralización, se añadieron diluciones en serie de suero obtenido de la sangre a pocillos de microplaca que contenían células Vero, seguido de cantidades tituladas de virus del SRAS. Después de 2 días, se registró el efecto citopático por inspección visual. También se desarrolló un ELISA convencional usando células Vero infectadas con virus del SRAS lisadas en SDS al 3% como antígeno.
- 15 Para la producción del clon de células B que produce anticuerpos monoclonales específicos para el virus del SRAS, se seleccionó la sangre del paciente que mostró el título más elevado de anticuerpos de unión y neutralizantes.
- 20 Se aislaron células B de memoria que portan IgG superficial usando microperlas anti-IgG humana, se incubaron con VEB (50% del sobrenadante de células B95-8) durante 6 horas y después se sembraron a 10 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en presencia de 2,5 µg/ml de CpG 2006 y PBMC irradiadas alogénicas (en estos experimentos se omitió IL-2). Después de dos semanas, se exploraron los sobrenadantes de cultivo para la presencia de anticuerpos específicos.
- 25 De los 1042 sobrenadantes de cultivo ensayados, 165 se valoraron positivos en el ensayo ELISA (Figura 1). De estos cultivos, 23 se clonaron como anteriormente y se aislaron clones específicos de 16 de ellos. Algunos de los anticuerpos monoclonales humanos aislados reconocen la nucleoproteína del virus del SRAS en transferencias de western, mientras que otros no, lo que sugiere que pueden reconocer diferentes proteínas virales (datos no mostrados). Ninguno de estos anticuerpos mostró actividad neutralizante.
- 30 De los 1042 sobrenadantes de cultivo ensayados en el ensayo de neutralización, siete mostraron un bajo nivel de actividad neutralizante mientras que dos (A11 y D8) mostraron un elevado título neutralizante (1/512 y 1/256 respectivamente). El cultivo A11 se clonó por dilución limitante en presencia de CpG y PBMC irradiadas y se aislaron varios clones de células B con actividad neutralizante comparablemente elevada (Figura 2). Los anticuerpos A11 no se unieron en el ensayo ELISA, pero tiñeron las proteínas espiga de superficie del virus del SRAS detectadas por microscopía electrónica (datos no mostrados).
- 35 Por lo tanto, usando este procedimiento es posible producir anticuerpos neutralizantes específicos para un antígeno usando solamente una pequeña muestra de sangre (aproximadamente 10 ml) en un corto espacio de tiempo (30-40 días). El procedimiento también permite la selección del mejor anticuerpo a partir de una gran combinación, y por lo tanto es un procedimiento de alto rendimiento.
- 40 Los anticuerpos anti-SRAS neutralizan el virus del SRAS a concentraciones de ~5 ng/ml. La neutralización del virus sincitial respiratorio (VSR, una causa común de infecciones del tracto respiratorio, especialmente en niños) por anticuerpos humanizados disponibles en el mercado producidos por técnicas convencionales requiere una concentración de anticuerpos aproximadamente 1000 veces mayor (Johanson y col. 1997). Por lo tanto, los anticuerpos completamente humanos producidos por el procedimiento de la invención parecen ser aproximadamente 1000 veces más eficaces. Esto sugiere que deberían ser suficientes cantidades muy pequeñas del anticuerpo descrito en este documento para prevenir o curar una infección de SRAS.

Ejemplo 4: Exploración de pacientes convalecientes con virus del SRAS para anticuerpos

Se obtuvo sangre periférica de un paciente en diferentes momentos después de infección aguda con virus del SRAS (2, 4 y 6 meses después de la infección). Se aislaron PBMC por centrifugación en gradiente. Se aislaron células B de memoria IgG⁺ por un procedimiento mejorado que evita activar el receptor de células B. Se aislaron las células B totales de PBMC usando microperlas CD22 (Miltenyi), que se descubrió que era incluso mejor que usar microperlas CD19. Las células se tiñeron con anticuerpos contra IgM, IgD e IgA humanas y se aislaron células negativas que portan IgG de superficie por clasificación celular. Se pulsaron células B con VEB (50% del sobrenadante de células B-95-8) durante 8 horas y después se sembraron a 10 células/pocillo en microplacas con fondo en U de 96 pocillos en medio RPMI completo suplementado con FCS al 10%, 2,5 µg/ml de CpG 2006 y PBMC irradiadas (2x10⁵/ml). En este experimento no se usó IL-2. Después de 2 semanas, se exploraron los sobrenadantes de cultivo para la presencia de anticuerpos específicos usando los tres ensayos descritos a continuación. Los cultivos positivos se clonaron por dilución limitante en presencia de CpG 2006 y PBMC irradiadas como anteriormente. Los clones positivos se expandieron y se purificó el anticuerpo producido a partir de los sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A (Amersham).

El aislado Frankfurt del virus del SRAS (número de acceso a Genbank AY310120) se usó para tres ensayos *in vitro*:

ELISA Se infectaron células Vero a una multiplicidad de infección de 0,01 unidades formadoras de placas por célula. El sobrenadante de cultivo celular recogido después de 2 días se aclaró por centrifugación a 3000 rpm, 5 min. El sobrenadante se sometió a centrifugación a 20.000 rpm durante 2 horas en un rotor Beckman SW28 a través de un lecho de sacarosa al 20%. El sedimento se purificó usando un gradiente de tartrato de potasio/glicerol y se resuspendió en 500 µl de tampón TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM) a una concentración de proteínas de aproximadamente 0,5 mg/ml. La suspensión de antígeno usada para el ensayo ELISA se preparó añadiendo SDS al 1% al sedimento viral seguido de ebullición durante 10 min. Las placas ELISA se recubrieron con una dilución 1:1000 de antígeno del virus del SRAS en tampón fosfato 0,1 M. Se añadieron diluciones de sueros o sobrenadante de cultivo y se detectaron anticuerpos IgG1 específicos usando anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina. Los resultados se expresaron en unidades arbitraria (UA) relativas a la muestra de 2 meses (=1000 UA). Los sueros de 20 donantes normales ensayados fueron negativos (<1 UA).

Tinción Se detectaron anticuerpos específicos para la proteína espiga nativa del virus del SRAS por citometría de flujo. En resumen, se clonó el gen de la proteína espiga del virus del SRAS en un vector apropiado y se transcribió el ARNm *in vitro* y se usó para transfectar células BHK por electroporación. Los transfectantes se incubaron con sobrenadantes de cultivo o suero, se lavaron y se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con APC. Este ensayo detecta anticuerpos IgG1 dirigidos contra el antígeno espiga nativo, la mayor parte de los cuales tiene actividad neutralizante. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA) relativas a la muestra de 2 meses (=1000 UA). Los sueros de 20 donantes normales ensayados fueron negativos (<1 UA).

Neutralización *in vitro* Se diluyeron sueros o sobrenadantes de cultivo en etapas log 2 y se mezclaron con 75 DICT₅₀ del virus del SRAS en 25 µl (el título del virus se determinó de acuerdo con el procedimiento de Karber). La mezcla se incubó durante 45 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 50 µl de células Vero tratadas con tripsina (1,5 x 10⁵ por ml) y se incubaron durante 3 días a 37°C y finalmente, se determinó el título de neutralización por inspección visual para dar la dilución de suero que neutraliza 75 DICT₅₀ del virus del SRAS. Los ensayos se realizaron en un laboratorio de nivel 4 de bioseguridad.

Los resultados fueron los siguientes:

Meses después de la infección	Anticuerpo anti-SRAS detectado por		
	ELISA	Tinción de espiga	Neutralización
2	1000	1000	1/128
4	650	700	1/128
6	300	400	1/128

Aunque los sueros normales fueron negativos, el suero del paciente recogido en diferentes momentos puntuales después de la aparición de la enfermedad aguda se valoró positivo en los tres ensayos. Los anticuerpos detectados por ELISA y los que tiñeron células transfectadas con la proteína espiga fueron más elevados 2 meses después de la infección y disminuyeron a aproximadamente un tercio en seis meses. En contraste, los anticuerpos neutralizantes permanecieron constantes con un título de 1/128. El isotipo de los anticuerpos detectados en los ensayos de unión a la proteína espiga y ELISA fue exclusivamente IgG1, no detectándose anticuerpos IgA o IgM (datos no mostrados). Por tanto, el suero posterior a la infección de esta persona tenía títulos moderados de anticuerpos neutralizantes

contra el virus del SRAS y anticuerpos IgG que se unieron a las proteínas espiga y detectaron antígenos desnaturalizados en ELISA.

Ejemplo 5: Cinética y frecuencias de células B de memoria específicas

5 Se immortalizaron linfocitos B de memoria IgG⁺ de los sueros post-SRAS de 2 meses, 4 meses y 6 meses con VEB en condiciones en que la cantidad de células B por cultivo era limitante, como se ha descrito anteriormente (10 células B por pocillo). Esta estrategia permite el análisis del producto de solamente unas pocas células B de memoria por cultivo, asegurando de este modo que el anticuerpo específico detectado en cultivos positivos es monoclonal y, al mismo tiempo, aumentando la probabilidad de aislar un clon productor del anticuerpo deseado por dilución limitante. Después de dos semanas de cultivo en presencia de VEB, CpG 2006 y células de alimentación
10 irradiadas, se exploraron los sobrenadantes de cultivo para la presencia de anticuerpos IgG específicos usando ELISA o tinción de transfectantes espiga. La frecuencia de cultivos positivos a la exploración en el ensayo ELISA del virus del SRAS o en la tinción de transfectantes de la proteína espiga del virus del SRAS fueron las siguientes:

Meses después de la infección	Cultivos positivos/cultivos totales explorados (%)	
	ELISA	Tinción de espiga
2	275/480 (57,3%)	No determinado
4	123/480 (25,6%)	12/576 (2,1%)
6	44/480 (9,2%)	21/768 (2,7%)

15 La frecuencia de cultivos productores de anticuerpos detectados por el ensayo ELISA fue muy elevada 2 meses después de la infección y disminuyó en los 4 y 6 meses. La frecuencia de cultivos productores de anticuerpos contra la proteína espiga nativa medida a los 4 y 6 meses fue inferior. De forma importante, los cultivos valorados positivos para anticuerpos ELISA fueron distintos de los que contenían anticuerpos contra la proteína espiga, lo que indica que los dos ensayos detectan especificidades de anticuerpo distintas no solapantes. Además, una proporción considerable de células B de memoria IgG⁺ es específica para la proteína espiga.

20 Entonces se realizaron ensayos para ver si hay una correlación entre la unión a la proteína espiga y la actividad neutralizante. Se ensayaron 56 sobrenadantes de cultivo que tiñeron células transfectadas con la proteína espiga para su capacidad de neutralizar el mismo aislado de virus del SRAS a partir del cual se clonó la proteína espiga (Fig. 3A). Aunque los anticuerpos con la tinción más elevada mostraron elevados títulos neutralizantes, hubo algunos anticuerpos que neutralizaron de forma eficaz a pesar de la pobre tinción mientras que otros teñían
25 transfectantes espiga, pero no lograban neutralizar. Además, cuando se analizaron 11 sobrenadantes con elevado título neutralizante, no fue evidente una correlación clara entre la tinción y la neutralización (Fig. 3B). Tomados en conjunto, estos resultados indican que a nivel clonal, la respuesta a la proteína espiga es heterogénea y que no todos los anticuerpos anti-espiga producidos en el trascurso de la infección natural son capaces de neutralizar el virus.

30 Ejemplo 6: Aislamiento de anticuerpos monoclonales contra el virus del SRAS

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que es posible interrogar el repertorio de memoria de células B humanas con una diversidad de ensayos para identificar cultivos que producen un anticuerpo de la especificidad deseada. En estos experimentos, 29 de 38 intentos (76%) en cultivos positivos a clonación condujeron al aislamiento de uno o más clones productores de anticuerpos de la especificidad seleccionada. Los clones VEB eran estables y se recuperaron anticuerpos monoclonales en el sobrenadante de cultivo a concentraciones de 10-20 µg/ml. De estos
35 29, 21 fueron positivos en el ensayo ELISA y 8 fueron positivos en el ensayo de tinción de la proteína espiga y también fueron capaces de neutralizar el virus del SRAS.

De los 21 clones independientes que se valoraron positivos en el ensayo ELISA, 13 (62%) produjeron anticuerpos específicos para la nucleoproteína del virus del SRAS (NP) detectada por transferencia de Western, mientras que 5
40 no reconocieron NP, pero tiñeron células infectadas con el virus del SRAS, y las 3 restantes reaccionaron solamente en el ensayo ELISA. Como se esperaba, ninguno de estos anticuerpos mostró actividad neutralizante.

De los 8 clones independientes que teñían los transfectantes espiga y que neutralizaban el virus del SRAS, uno (S3.1, IgG1κ) se seleccionó para ensayos de neutralización *in vivo*. El anticuerpo monoclonal de este clon se purificó del sobrenadante de cultivo y se ensayó para su capacidad de teñir células transfectadas con la proteína espiga y de neutralizar el virus del SRAS (Fig. 4). S3.1 neutralizó 75 DICT₅₀ del virus del SRAS a concentraciones de ~300
45 ng/ml, y fue hasta 300 veces más potente que el suero de convalecientes. Además, S3.1 neutralizó los aislados Frankfurt y Urbani con la misma eficacia (datos no mostrados), y tiñeron las espigas del CoV del SRAS detectadas por inmunomicroscopía electrónica (Fig. 5).

Ejemplo 7: S3.1 neutraliza la infección por SRAS en un modelo animal

Se ensayó la actividad neutralizante *in vivo* del anticuerpo monoclonal S3.1 en un modelo de ratón de infección aguda de SRAS. El anticuerpo purificado se transfirió a ratones vírgenes por inyección intraperitoneal para determinar si el anticuerpo solo podía evitar la replicación del virus del SRAS en el tracto respiratorio.

5 Los doctores L.J. Anderson y T.G. Ksiazek del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, proporcionaron virus del SRAS (cepa Urbani) para su uso en un ensayo de neutralización *in vivo*. El virus se aisló y se pasó dos veces en células Vero E6 en el CDC y se pasó en células Vero para dos pases adicionales en nuestro laboratorio para generar una solución madre de virus con un título de $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml. Las células Vero se mantuvieron en OptiPro SFM (Invitrogen). Todo el trabajo con virus infeccioso se realizó dentro de una cabina de bioseguridad, en una instalación de contención de nivel 3 de bioseguridad y el personal llevaba respiradores eléctricos purificadores del aire (3M HEPA AirMate, Saint Paul, MN). Los estudios con ratones se aprobaron por el NIH Animal Care and Use Committee y se realizaron en una instalación aprobada de nivel 3 de bioseguridad animal. Todo el personal que entraba en la instalación tenía que llevar respiradores eléctricos purificadores del aire.

15 Se alojaron ratones BALB/c hembra de cuatro a seis semanas de edad adquiridos de Taconic (Germantown, NY), 4 ratones por jaula. En el día 0, los ratones, ligeramente anestesiados con isoflurano, se inyectaron por vía intraperitoneal con 3 dosis diferentes (800, 200, 50 µg) de anticuerpo S3.1 en 500 µl o con el mismo volumen de una Ig humana policlonal que carece de actividad neutralizante. Después de 24 horas, los ratones se expusieron por vía intranasal con 10^4 DICT₅₀ del coronavirus del SRAS. Después de dos días adicionales, se sacrificó a los ratones y se retiraron sus pulmones y cornetes nasales y se homogeneizaron en una suspensión al 5% p/v en medio Leibovitz 15 (Invitrogen). Las muestras tisulares se evaluaron para la infección, y los títulos de virus se determinaron como se ha descrito anteriormente. Los títulos de virus se expresaron como log₁₀ DICT₅₀ por gramo de tejido:

Anticuerpo	Replicación de virus en ratones expuestos			
	Pulmones		Cornetes nasales	
	Cantidad de infectados	Título medio de virus(± ET)	Cantidad de infectados	Título medio de virus (± ET)
S3,1 800 µg	0/4	≤1,5±0*	2/4	2,5±0,47
S3,1 200 µg	0/4	≤1,5±0*	4/4	3,4±0,41
S3,1 50 µg	2/4	3,2±1,36	4/4	4,8±0,75
Control 800 µg	4/4	7,5±0,1	4/4	6,4±0,41

El límite inferior de detección de virus infeccioso en una suspensión al 10% p/v de homogeneizado pulmonar fue 1,5 log₁₀ DICT₅₀/g y en suspensión al 5% p/v de cornetes nasales fue de 1,8 log₁₀ DICT₅₀/g. Estos valores indican, por tanto, ausencia de virus detectable.

25 Los ratones que recibieron mAb S3.1 estuvieron de este modo protegidos de la replicación del virus de exposición, particularmente en el tracto respiratorio inferior. Las diferencias en los títulos de virus en comparación con el control fueron estadísticamente significativas (p<0,05) en un ensayo t de Student. Se observó una restricción significativa de replicación del virus en el tracto respiratorio superior en los ratones que recibieron la dosis más elevada de mAb S3.1.

Ejemplo 8: R-848

30 R-848 es un agonista de TLR7 y TLR8. Este compuesto se comparó con CpG 2006 en términos de eficacia de inmortalización inducida por VEB de células B humanas. Se aislaron células B de memoria de donantes sanos usando microperlas magnéticas anti-CD19 o anti-CD22 seguido de reducción negativa de células que portan IgM, IgD e IgA (o IgG). Se establecieron 48 cultivos duplicados en microplacas con fondo en U de 96 pocillos por dilución limitante a 30, 10 y 3 células B por pocillo en medio completo en presencia de células mononucleares irradiadas, VEB (20% del sobrenadante de células B95-8) y en presencia o ausencia de 2,5 µg/ml de CpG 2006 o 2,5 µg/ml de R-848. La frecuencia de cultivos positivos para el crecimiento celular y la producción de Ig se midió después de 14 días y se calculó la eficacia de transformación. Los resultados son los siguientes:

Fuente de células B	VEB	+ CpG 2006	+ R848
Donante AOS CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ IgA ⁻	1 en 150	1 en 3,5	1 en 2,5
Donante AOS CD22 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ IgA ⁻	1 en 300	1 en 2	1 en 1,5
Donante ASC CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ IgA ⁻	1 en 320	1 en 2	1 en 2,4
Donante ASC CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ IgG ⁻	1 en 280	1 en 4	1 en 2,2
Donante ETR CD22 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻	1 en 230	1 en 1,9	1 en 2

5 R-848 y CpG 2006 por tanto son comparables en su capacidad de aumentar la eficacia de la inmortalización inducida por VEB. Además, R-848 fue comparable con CpG 2006 en la capacidad de aumentar la eficacia de clonación de líneas de células B policlonales inmortalizadas por VEB. En presencia de R-848, la eficacia de clonación de las líneas celulares VEB variaba del 25 al 100% en 10 experimentos independientes.

Ejemplo 9: Aislamiento de anticuerpos de elevada afinidad neutralizantes del CoV del SRAS

10 Se produjo una nueva serie de anticuerpos monoclonales con capacidad neutralizante del CoV del SRAS como se ha descrito anteriormente a partir de células B de memoria inmortalizadas aisladas de un paciente convaleciente seis meses después de la infección. Se ensayaron diluciones en serie de los sobrenadantes de los clones de células B para su especificidad de antígeno (NP, matriz (M) o proteína espigas), y su capacidad de neutralizar el efecto citopático del CoV del SRAS (aislado Frankfurt) en células Vero. La concentración de IgG monoclonal se midió por ELISA en los mismos sobrenadantes de cultivo. Los títulos neutralizantes se expresaron como la concentración final de IgG (ng de IgG por ml) en cultivo tisular capaz de neutralizar completamente el virus (valores medios de al menos 15 tres ensayos). Los resultados son los siguientes:

Clon de célula B	Isotipo	Especificidad	Título neutralizante
S18.1	IgG, κ	NP	-
S20.1	IgG, λ	NP	-
S21.1	IgG, κ	NP	-
S23.4	IgG, κ	NP	-
S24.1	IgG, λ	NP	-
S13.1	IgG, κ	No determinada	-
S5.1	IgG, κ	M	-
S3.1	IgG, κ	Espiga	300
S101.1	IgG, κ	Espiga	40
S102.1	IgG, κ	Espiga	850
S103.3	IgG, κ	Espiga	350
S104.1	IgG, κ	Espiga	150
S105.2	IgG, κ	Espiga	150
S106.1	IgG, κ	Espiga	45
S107.4	IgG, κ	Espiga	75
S108.1	IgG, κ	Espiga	40
S109.2	IgG, κ	Espiga	80

Clon de célula B	Isotipo	Especificidad	Título neutralizante
S132.9	IgG, κ	Espiga	200
S128.5	IgG, κ	Espiga	25
S127.6	IgG, κ	Espiga	40
S124.4	IgG, κ	Espiga	40
S159.1	IgG, λ	Espiga	25
S160.1	IgG, κ	Espiga	15

Por tanto, la invención es capaz, de forma rutinaria, de proporcionar anticuerpos que pueden neutralizar el virus a concentraciones inferiores de 10^{-9} M e incluso por debajo de 10^{-10} M (el PM de IgG humana es ~150 kDa, y por tanto 150 ng/ml es $\sim 10^{-9}$ M).

Referencias

- Bernasconi y col. (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: upregulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." *Blood* 101:4500-04
- Bernasconi y col. (2002). "Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells." *Science* 298(5601): 2199-202.
- Bron y col. (1984). "Production of human monoclonal IgG antibodies against Rhesus (D) antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(10): 3214-7.
- Casali y col. (1986). "Human monoclonals from antigen-specific selection of B lymphocytes and transformation by EBV." *Science* 234(4775): 476-9.
- Diebold y col. (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*. 2004 Feb 19 [Epub avance de la edición impresa]
- Drosten y col. (2003) "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome" *N Engl J Med* 348(20):1967-76.
- Fields y col. (1996). "Virology." Lippincott-Raven, Nueva York. También "Fields' Virology", 4ª edición (2001) redactores jefe Knipe y Howley, ISBN 0-7817-1832-5.
- Giachino y col. (1995) "kappa+lambda+ dual receptor B cells are present in the human peripheral repertoire." *J Exp Med* 181, 1245-50.
- Hartmann y col. (2000). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* 164(3): 1617-24.
- Heil y col. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Feb 19 [Epub avance de la edición impresa]
- Hemmi y col. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* 3(2): 196-200.
- Iversen y col. (1993). "Effect of cell-derived growth factors and cytokines on the clonal outgrowth of EBV-infected B cells and established lymphoblastoid cell lines." *Hum Antibodies Hybridomas* 4(3): 115-23.
- Johanson y col. (1997). "Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus." *J Infect Dis* 176: 1215-24.
- Karber (1931). "50% end-point calculation". *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480-483.
- Kohler y Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-7.
- Kozbor y Roder (1981). "Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique." *J Immunol* 127(4): 1275-80.

- Kozbor y col. (1982). "Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma." *Hybridoma* 1(3): 323-8.
- Krieg (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." *Annu Rev Immunol* 20: 709-60.
- Krieg y col. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* 374(6522): 546-9.
- 5 Ksiazek y col. (2003). "A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome" *N Engl J Med* 348 (20):1953-66.
- Lanzavecchia (1985). "Antigen-specific interaction between T and B cells." *Nature* 314(6011): 537-9.
- Lundgren y col. (1983). "Monoclonal anti-parasite and anti-RBC antibodies produced by stable EBV-transformed B cell lines from malaria patients." *J Immunol* 131(4): 2000-3.
- 10 Medzhitov y Janeway (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." *Immunol Rev* 173:89-97.
- Medzhitov y Janeway (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system" *Science* 296:298-300.
- 15 Rosen y col. "Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro." *Nature* 267 (5607): 52-4.
- Rosen y col. (1983). "Human monoclonal antibodies to a genus-specific chlamydial antigen, produced by EBV-transformed B cells." *J Immunol* 130(6): 2899-902.
- Schneider y col. (1999) "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth". *J Exp Med* 189(11):1747-56.
- 20 Steinitz y col. (1980). "Continuous production of monoclonal rheumatoid factor by EBV-transformed lymphocytes." *Nature* 287(5781): 443-5.
- Steinitz y col. (1977). "EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody." *Nature* 269(5627): 420-2.
- 25 Steinitz y col. (1984). "Human anti-pneumococci antibody produced by an Epstein Barr virus (EBV)-immortalized cell line." *J Immunol* 132(2): 877-82.
- Takeda y col. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376
- Thompson y col. (1986). "The efficient production of stable, human monoclonal antibody-secreting hybridomas from EBV-transformed lymphocytes using the mouse myeloma X63-Ag8.653 as a fusion partner." *J Immunol Methods* 94(1-2): 7-12.

30 **Lista de secuencias**

- <110> INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
LANZAVECCHIA Antonio
- <120> PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES MEDIANTE TRANSFORMACIÓN CON VEB
DE CÉLULAS B
- 35 <130> P033334WO
- <140>
<141>
- <150> GB 0304363.5
<151> 26-02-2003
- 40 <150> GB 0318431.4
<151> 06-08-2003
- <150> GB 0325391.1
<151> 30-10-2003
- 45 <150> US 60/516665
<151> 30-10-2003

ES 2 389 930 T3

<160> 1
<170> SeqWin99, versión 1.02
<210> 1
<211> 24
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> CpG ODN-2006
<300>
10 <301> Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM<302> Delineation of a CpG Phosphorotioate oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In vitro and In vivo<303> The Journal of Immunology<304> 164<305> 3<306> 1617-1624<307> 01-02-2000
<400> 1
15 tcgctgtttt gtcgttttgt cggt

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir linfocitos B de memoria inmortalizados, que comprende la etapa de transformar linfocitos B de memoria usando virus de Epstein Barr (VEB) en presencia de un activador de células B policlonales, en el que el activador de células B policlonales es un agonista de un receptor de reconocimiento de patrones que se expresa en células B de memoria.
- 10 2. Un procedimiento para producir un clon de un linfocito B de memoria humano inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano con una especificidad de antígeno deseada, que comprende las etapas de: (i) transformar una población de células que comprende o que consta de linfocitos B de memoria humanos con virus de Epstein Barr (VEB) en presencia de un activador de células B policlonales, en el que el activador de células B policlonales es un agonista de un receptor de reconocimiento de patrones que se expresa en células B de memoria; (ii) explorar el sobrenadante de cultivo para la especificidad de antígeno; y (iii) aislar un clon de linfocito B de memoria humano inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano que tenga la especificidad de antígeno deseada.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el activador de células B policlonales es un agonista de un receptor tipo Toll.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el activador de células B policlonales es un agonista del receptor tipo Toll-7 (TLR-7), receptor tipo Toll-9 (TLR-9) y/o receptor tipo Toll-10 (TLR-10).
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el activador de células B policlonales se selecciona entre el grupo que consiste en: oligodesoxinucleótidos CpG; R-848 y otros compuestos de imidazoquinolina que estimulan los TLR; imiquimod; loxoribina; 7-tia-8-oxoguanosina; 7-desazaguanosina; y anticuerpos monoclonales que imitan los efectos de estos activadores.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el activador de células B policlonales es CpG 2006.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que se añade un estimulador adicional del crecimiento y/o diferenciación celular durante la etapa de transformación.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho estimulador adicional es una citoquina.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha citoquina es IL-2 o IL-15.
- 30 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la clonación se realiza usando dilución limitante.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que se selecciona una subpoblación de linfocitos B de memoria humanos con una especificidad de antígeno específica antes de la etapa de transformación.
- 35 12. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho linfocito B de memoria produce un anticuerpo dirigido contra patógenos humanos tales como el virus del SRAS, el virus de la inmunodeficiencia humana; el virus de la hepatitis A; el virus de la hepatitis B; el virus de la hepatitis C; el virus del herpes simple tipo 1 o tipo 2; el virus del sarampión; el virus de las paperas; el virus de la rubéola; el virus de la rabia; el virus del Ébola; el virus de la influenza; el virus del papiloma; el virus vaccinia; el virus de varicela-zóster; virus de la viruela; virus de la polio; el rinovirus; el virus sincitial respiratorio; *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. malariae*; *P. ovale*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Clostridium tetani*; *Clostridium botulinum*; *Bordetella pertussis*; *Haemophilus influenzae*; *Neisseria meningitidis*, serogrupo A, B, C, W135 y/o Y; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus pyogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus anthracis*; *Moraxella catarrhalis*; *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Yersinia pestis*; *Francisella tularensis*; especies de *Salmonella*; *Vibrio cholerae*; *E. coli* tóxica; un retrovirus endógeno humano; otros patógenos microbianos; otras toxinas microbianas, alérgenos, antígenos tumorales, autoantígenos y aloantígenos, agentes químicos o toxinas.
- 40 13. Un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal humano que comprende preparar un linfocito B de memoria humano inmortalizado por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-12, cultivar dicho linfocito B de memoria humano inmortalizado y aislar el anticuerpo monoclonal humano.
- 45 14. Un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal humano que comprende las etapas de: (i) preparar un linfocito B de memoria humano inmortalizado por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12; (ii) obtener el ácido nucleico del linfocito B de memoria inmortalizado; (iii) insertar el ácido nucleico en un huésped de expresión para permitir la expresión del anticuerpo en este huésped.
- 50 15. El procedimiento de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar el anticuerpo monoclonal aislado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que los linfocitos B de memoria no se fusionan con otras células.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el linfocito B de memoria es un linfocito B de memoria humano.
- 5 18. Un procedimiento para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; (ii) obtener el ácido nucleico del clon de célula B que codifica un anticuerpo de interés; y (iii) insertar el ácido nucleico en un huésped de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese huésped.
- 10 19. Un procedimiento para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de célula B que codifica un anticuerpo de interés; y (iii) usar la información de la secuencia de la etapa (ii) para preparar el ácido nucleico para insertarlo en un huésped de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese huésped.
- 15 20. El procedimiento de la reivindicación 18 o reivindicación 19, en el que el huésped de expresión es una célula de levadura, una célula vegetal o una célula animal.
21. Un procedimiento para preparar una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; (ii) obtener del clon de célula B el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés.
- 20 22. Un procedimiento para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de célula B que codifica el anticuerpo de interés.
- 25 23. Un procedimiento para preparar un anticuerpo para uso farmacéutico, que comprende las etapas de: (i) preparar una célula B inmortalizada que produce un anticuerpo de interés por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12; (ii) obtener y/o secuenciar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés a partir de la célula B seleccionada; (iii) insertar el ácido nucleico en o usar el ácido nucleico para preparar un huésped de expresión que pueda expresar el anticuerpo de interés; (iv) cultivar o subcultivar el huésped de expresión en condiciones en que se exprese el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (v) purificar el anticuerpo de interés.
- 30 24. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18, 19 ó 23, en el que el ácido nucleico se manipula entre las etapas (ii) y (iii) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones, y/o para añadir u optimizar secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción.
25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13, 14 ó 23, en el que el anticuerpo está dirigido contra el virus sincitial respiratorio (VSR).

FIGURA 1

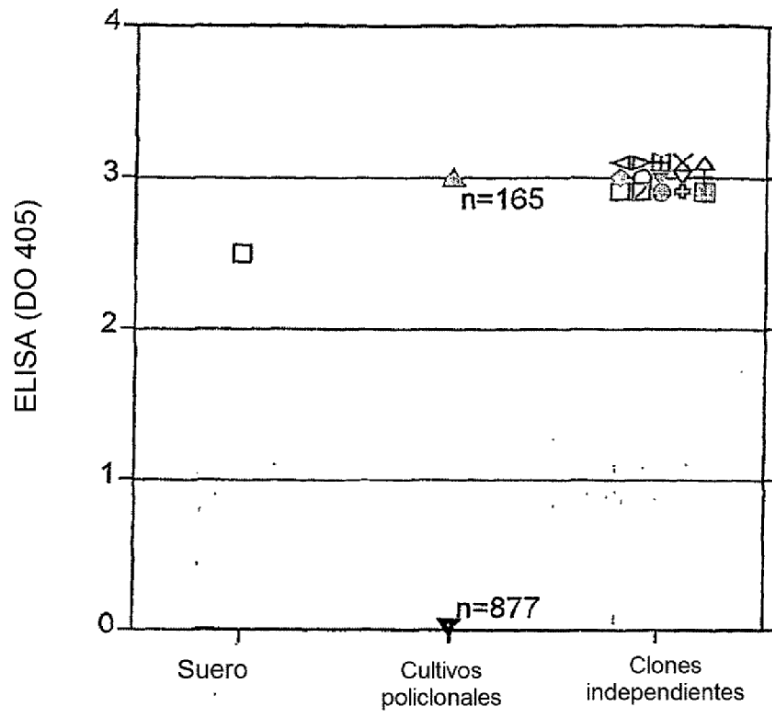


FIGURA 2

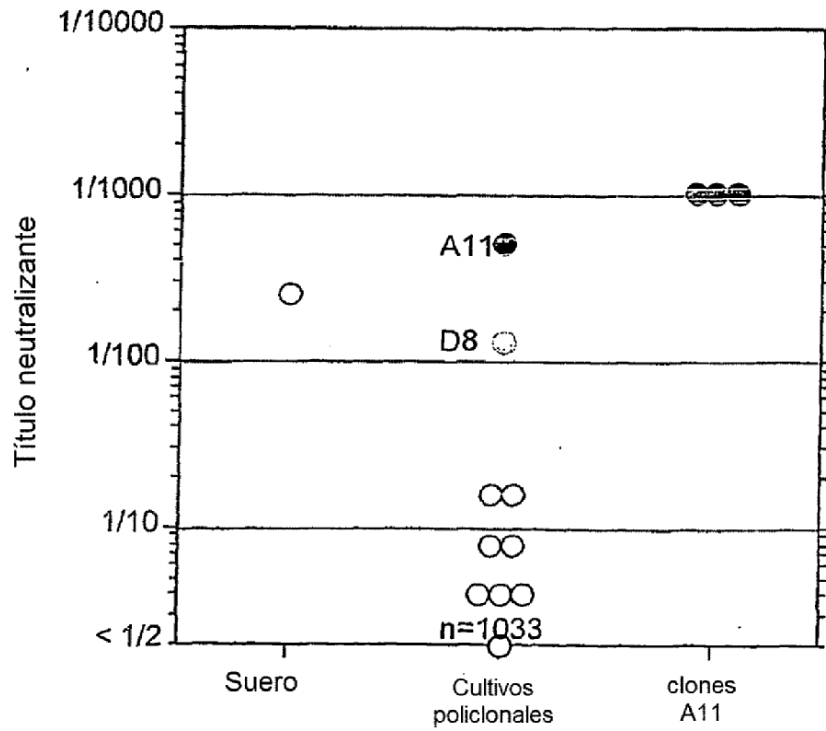


FIGURA 3

FIGURA 3A

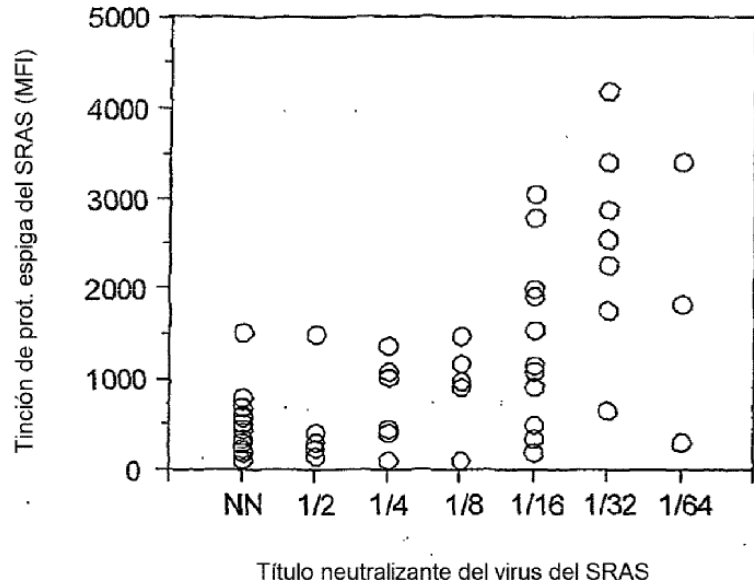


FIGURA 3B

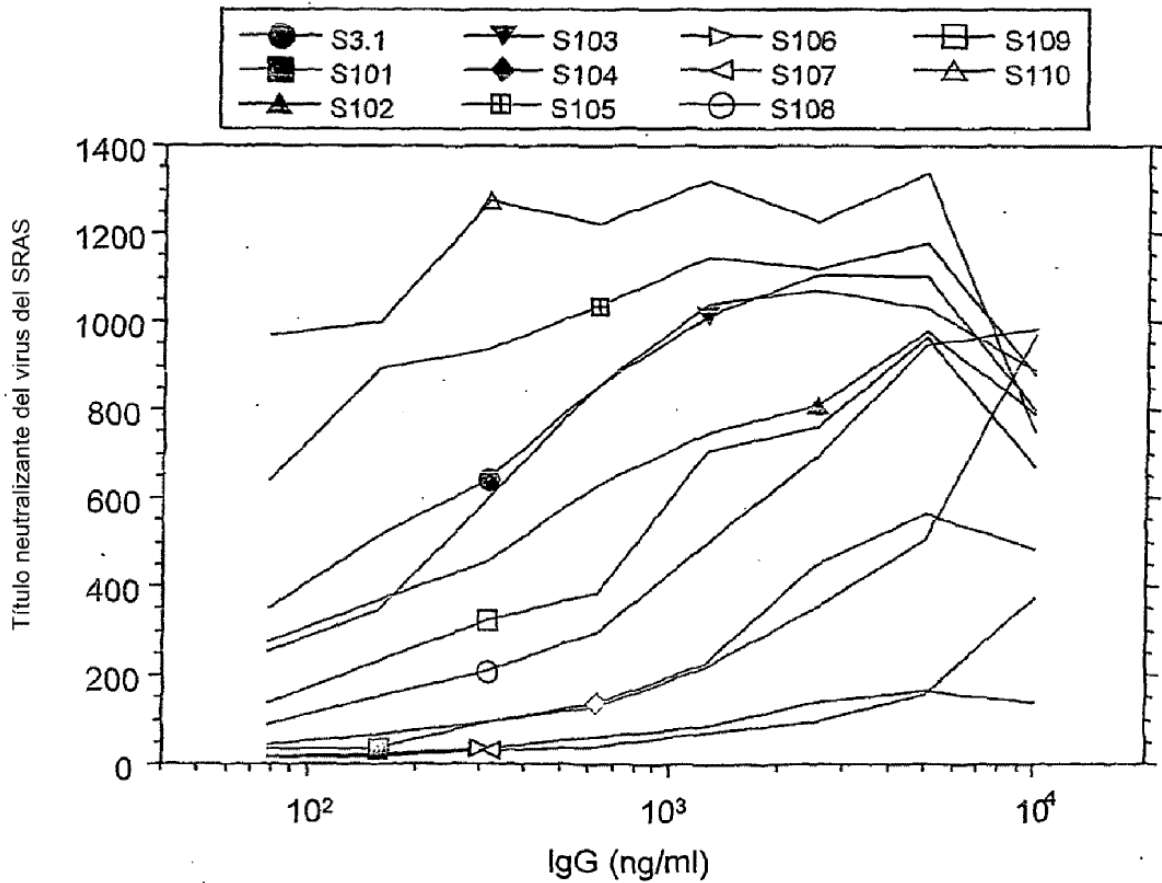


FIGURA 4

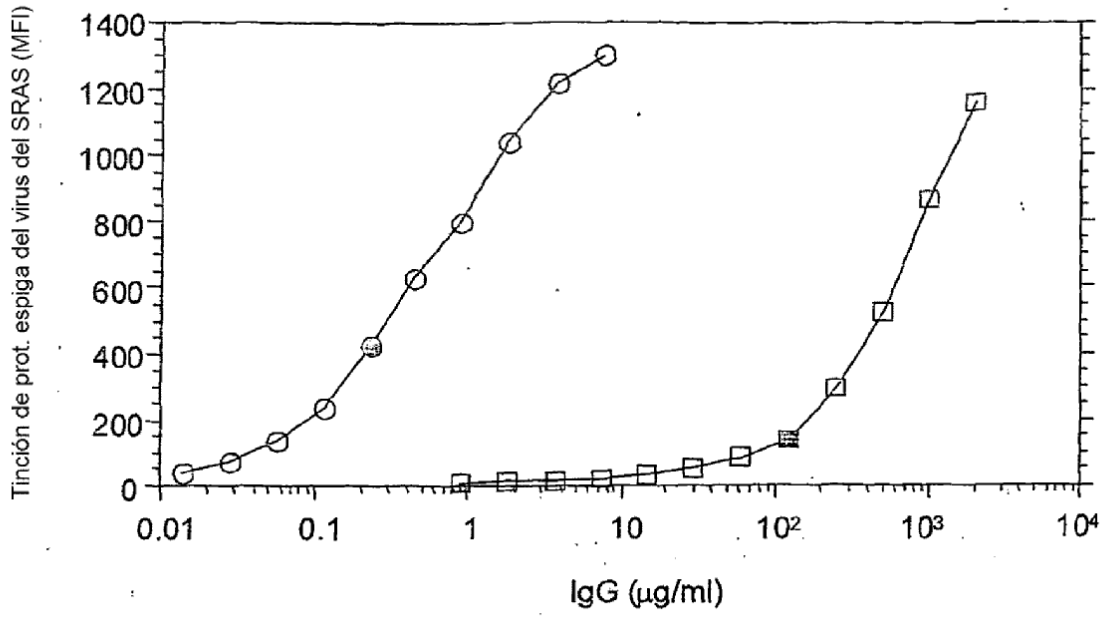


FIGURA 5

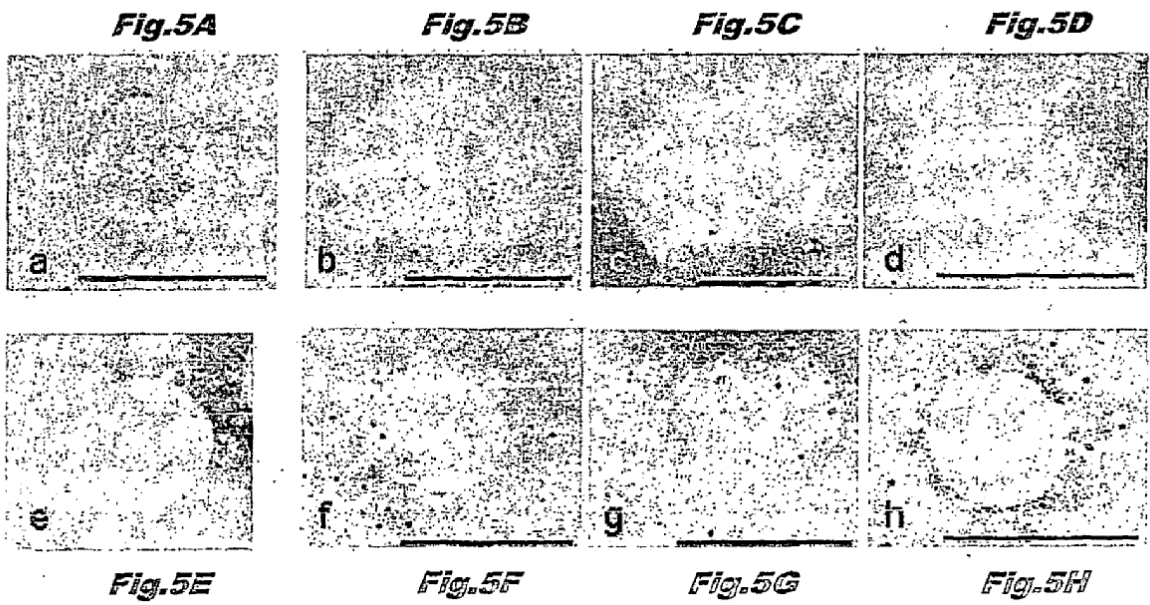


FIGURA 6

