

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 488**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/EP2012/073232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO2013076139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12788221 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2782931**

54 Título: **Células de mamífero que expresan CD40L y su uso**

30 Prioridad:

23.11.2011 EP 11190341

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.06.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ENDL, JOSEF;
FISCHER, JENS;
KERN, PETER;
OFFNER, SONJA;
PLATZER, JOSEF y
SEEBER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 488 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

Células de mamífero que expresan CD40L y su uso

5 La presente solicitud de patente se enmarca en el campo del cultivo de linfocitos B. En el presente documento se notifica un sistema de cultivo para la estimulación y expansión de células secretoras de anticuerpos derivadas de conejo y ser humano, tales como linfocitos B activados, plasmablastos y linfocitos B aislados de conejos o seres humanos inmunizados tras haber sobrevivido a una enfermedad en presencia de células nutrientes que expresan CD40L de conejo o humano.

10 Antecedentes de la invención

Se ha notificado la dificultad de cultivar in vitro linfocitos B aislados, plasmablastos y células plasmáticas aisladas de diferentes especies. En la práctica, esto se suele solventar mediante la generación de líneas de linfocitos B inmortales fusionando linfocitos B primarios con un socio de hibridoma o inmortalización. Para conejos, también se desarrolló un socio de fusión de plasmacitoma (Spieker-Polet, H., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (1995) 9348-9352, pero la técnica de hibridomas no funciona bien en conejos. Para una supervivencia sostenida de linfocitos B de conejo in vitro, es necesario proporcionar estímulos de activación esenciales y factores de supervivencia. Se han descrito diversos compuestos, como IL-2, IL-4, IL-10 y otros (véase p.ej. Zubler, R., *et al.*, Eur. J. Immunol. 14 (1984) 357-363, y J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183).

Fisiológicamente, los linfocitos B se activan al encontrarse con un antígeno específico en combinación con una activación adicional p.ej. a través de la vía CD40/CD40L (revisado en Néron, S., *et al.*, Arch. Immunol. Ther. Exp. 59 (2011) 25-40) y/o a través de citocinas y/o factores de crecimiento derivados de un contexto natural, p.ej. mediante células dendríticas o con la ayuda de linfocitos T.

En los sistemas in vitro, se puede imitar la interacción CD40/CD40L mediante co-cultivo con células de timoma EL4-B5 o la adición de anticuerpos anti-CD40 o CD40L solubles o inmovilizados. Los sistemas exclusivos carecen de suficiente potencia y se describen únicamente en combinación con otros estímulos necesarios mediante el uso de o bien diferentes mezclas nutrientes (p.ej. Zubler mix; IL-4, IL-10, etc.) (Zubler, R., *supra*) o bien sobrenadante de timocito (SNT).

Weitkamp, J-H., *et al.*, (J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237) notifican la generación de anticuerpos monoclonales humanos recombinantes en rotavirus a partir de linfocitos B individuales específicos de antígeno con partículas de tipo virus fluorescente. En el documento US 2006/0051348 se notifica un método de producción de una pluralidad de anticuerpos aislados para una pluralidad de antígenos afines. En los documentos WO 2008/144763 y WO 2008/045140 se notifican anticuerpos para IL-6 y sus usos, y método de cultivo para la obtención de una población clónica de linfocitos B específicos de antígeno, respectivamente. En el documento US 2007/0269868, se notifica un método de cultivo para obtener una población clónica de linfocitos B específicos de antígeno. Masri, *et al.* (en Mol. Immunol. 44 (2007) 2101-2106) notifican la clonación y expresión de *E. coli* de un fragmento Fab funcional obtenido desde un linfocito humano individual contra toxina ántrax. En el documento WO 2007/031550 se notifica un método para preparar bibliotecas de inmunoglobulina.

En el documento WO 2009/10515 se notifica un método para generar células híbridas que expresan anticuerpos útiles. En el documento WO 2008/085878 se notifican anticuerpos con alta afinidad que neutralizan enterotoxina B de *Staphylococcus*. Amanna, I.J., y Slifka, M.K. notifican la cuantificación de poblaciones de linfocitos B de memoria raras a través de dos enfoques independientes y complementarios (J. Immunol. Meth. 317 (2006) 175-185). En el documento WO 2011/052545 se notifica un método para producir una población de linfocitos B específicos de antígeno.

50 Sumario de la invención

En el presente documento se notifica un nuevo método para generar de manera rápida, eficiente y reproducible anticuerpos de conejo (o ser humano) partiendo de linfocitos B de conejo (o ser humano) que comprende al menos una etapa de cultivo.

En el presente documento se notifica además una mezcla nutriente que se puede utilizar en combinación con células de mamífero que expresan CD40L de conejo que proporciona una estimulación de linfocitos B de conejo y un sistema de cultivo muy eficientes.

En el presente documento se notifica además una mezcla nutriente que se puede utilizar en combinación con células de mamífero que expresan CD40L humano que proporciona una estimulación de linfocitos B humanos y un sistema de cultivo muy eficientes.

65 Uno de los aspectos que se notifican en el presente documento es un método para el co-cultivo de linfocitos B de conejo y células CHO o BHK que expresan CD40L de conejo en presencia de/en combinación con IL-2 e IL-21.

- En el presente documento se notifica un método para co-cultivar linfocitos B humanos y células de mamífero que expresan CD40L humanos.
- 5 En el presente documento se notifica un método para co-cultivar linfocitos B humanos y células de mamífero que expresan CD40L humano en presencia de/en combinación con IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.
- En un modo de realización, la célula de mamífero que expresa CD40L humano es una célula BHK o CHO.
- 10 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.
- En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.
- En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.
- 15 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es un método para producir un anticuerpo de conejo que comprende la etapa de cultivar uno o más linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo y células CHO o BHK que expresan CD40L de conejo en presencia de/combinación con IL-2 e IL-21 y recuperar el anticuerpo desde el sobrenadante de cultivo, produciendo en virtud de ello el anticuerpo de conejo.
- 20 En un modo de realización, IL-2 e IL-21 se añaden en el inicio del cultivo.
- En un modo de realización, IL-2 e IL-21 se añaden únicamente en el inicio del cultivo.
- 25 En un modo de realización, el linfocito B de conejo es un linfocito B de conejo no tratado previamente o inmaduro.
- En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B IgG positivo (IgG⁺). Los linfocitos B IgG positivos presentan el marcador de IgG de superficie de la célula que se pueden detectar y marcar.
- 30 En el presente documento se notifica un método para producir un anticuerpo humano que comprende la etapa de cultivar un linfocito B humano que secreta anticuerpo y células de mamífero que expresan CD40L humano y recuperar el anticuerpo desde el sobrenadante de cultivo produciendo así el anticuerpo humano.
- En un modo de realización, la célula de mamífero que expresa CD40L humano es una célula BHK o CHO.
- 35 En el presente documento se notifica un método para producir un anticuerpo humano que comprende la etapa de cultivar uno o más linfocitos B humanos que secretan anticuerpo y células de mamífero que expresan CD40L humano en presencia de/en combinación con IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 y recuperar el anticuerpo desde el sobrenadante de cultivo, produciendo en virtud de ello el anticuerpo humano.
- 40 En un modo de realización, el cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.
- En un modo de realización, el cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.
- 45 En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el cultivo son todas ellas interleucinas humanas.
- En un modo de realización, la célula de mamífero que expresa CD40L humano es una célula BHK o CHO.
- En un modo de realización, las interleucinas se añaden en el inicio del cultivo.
- 50 En un modo de realización, las interleucinas se añaden únicamente en el inicio del cultivo.
- En un modo de realización, el linfocito B humano es un linfocito B humano maduro.
- 55 En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B IgG positivo (IgG⁺). Los linfocitos B IgG positivos presentan el marcador de IgG de la superficie de la célula que se pueden detectar y marcar.
- En el presente documento se notifica un kit que comprende células CHO que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL-21.
- 60 En el presente documento se notifica un kit que comprende células BHK que expresan CD40L humano e IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.
- En un modo de realización, el kit comprende IL-2 e IL-21.
- 65 En un modo de realización, el kit comprende IL-2 e IL-21 e IL-6.

En un modo de realización, las interleucinas son todas ellas interleucinas humanas.

En el presente documento se notifica un método para el co-cultivo de linfocitos B que comprende el co-cultivo de linfocitos B y células de mamífero que expresan CD40L en presencia de IL-2 o IL-21.

En el presente documento se notifica un método para el co-cultivo de linfocitos B que comprende el co-cultivo de linfocitos B y células de mamífero que expresan CD40L en presencia de IL-2 e IL-21.

En el presente documento se notifica un método para el co-cultivo de linfocitos B de conejo que comprende el co-cultivo de linfocitos B de conejo y células de mamífero que expresan CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO o una célula BHK.

En el presente documento se notifica un método para el co-cultivo de linfocitos B que comprende el co-cultivo de linfocitos B y células de mamífero que expresan CD40L en presencia de IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.

En un modo de realización, el co-cultivo en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

En el presente documento se notifica un método para el co-cultivo de linfocitos B humanos que comprende el co-cultivo de linfocitos B humanos y células de mamífero que expresan CD40L humano en presencia de IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.

En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula BHK o una célula CHO.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

En el presente documento se notifica un método para cultivar linfocitos B que secretan compuestos de inhibición de linfocitos T que comprende el co-cultivo de linfocitos B y células de mamífero que expresan CD40L.

En el presente documento se notifica un método para el cultivo de linfocitos B que secretan anticuerpo que comprende en el siguiente orden

i) un primer co-cultivo de linfocitos B y una célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante mitogénico y

ii) un posterior segundo co-cultivo del linfocito B y la célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante de producción de anticuerpo.

En un modo de realización, el primer y el segundo co-cultivo se realizan en el mismo vaso de cultivo.

En un modo de realización, el método para el cultivo de los linfocitos B que secretan anticuerpo comprende un co-cultivo del linfocito B y una célula de mamífero que expresa CD40L conforme a lo cual se añade un primer estimulante mitogénico al cultivo y, a continuación, se añade al cultivo un estimulante de producción de anticuerpo.

En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo al menos una hora después de añadir el estimulante mitogénico. En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo de uno a tres días después de añadir al cultivo el estimulante mitogénico.

En un modo de realización, el estimulante mitogénico se selecciona del grupo que consiste en CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-14, Interleucina-21, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ). La activación de linfocito B también podría inducirse a través de anticuerpos anti-IgG, anti-CD20, y/o anti-CD27.

En un modo de realización, el estimulante de producción de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3,

5 Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Interleucina-9, Interleucina-10, Interleucina-13, Interleucina-21, Interleucina-33, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ). Podría inducirse una mayor estimulación del linfocito B también a través de anticuerpos anti-IgG, anti-CD20, y/o anti-CD27.

En un modo de realización, se añade el estimulante mitogénico al comienzo del primero co-cultivo.

10 En un modo de realización, se añade el estimulante mitogénico 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después del comienzo del primero co-cultivo.

En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después de la adición del estimulante mitogénico.

15 En un modo de realización, cada uno de los cultivos se realiza durante 5 a 14 días.

En un modo de realización, el cultivo se realiza durante un período total comprendido entre 5 y 21 días. En un modo de realización, el cultivo se realiza durante un período total comprendido entre 6 y 14 días.

20 En un modo de realización, se retira el estimulante mitogénico antes del inicio del segundo co-cultivo. En un modo de realización, se retira cambiando el sobrenadante de cultivo y/o lavando las células con un medio neutro.

25 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es un método para producir un anticuerpo, que se une específicamente a un antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una población de linfocitos B de conejo (maduras) que secreta anticuerpo.

b) teñir las células de la población de linfocitos B de conejo con al menos un colorante fluorescente. (En un modo de realización, con de uno a tres, o de dos a tres colorantes fluorescentes).

30 c) depositar las células individuales de la población de linfocitos B de conejo teñida o una agrupación de células de la población de linfocitos B de conejo teñida en recipientes individuales. (En un modo de realización, el recipiente es un pocillo o una placa de múltiples pocillos),

d) cultivar los linfocitos B de conejo depositados en presencia de células de mamífero que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL-21,

35 e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B de conejo, f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos que se unen específicamente por PCR de transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y obteniendo así un dominio variable de cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico,

40 g) introducir el dominio variable de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,

h) introducir el ácido nucleico en una célula,

i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo desde la célula o el sobrenadante de cultivo de la célula para producir así un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

45 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de un estimulante mitogénico y/o un estimulante de producción de anticuerpo.

En un modo de realización, el cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

50 En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

En un modo de realización, la agrupación de células comprende entre aproximadamente 10 linfocitos B y aproximadamente 1.000.000 de linfocitos B. En un modo de realización, la agrupación comprende entre aproximadamente 500 linfocitos B y aproximadamente 100.000 linfocitos B. En un modo de realización, la agrupación comprende aproximadamente 500 linfocitos B.

55 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, que comprende las siguientes etapas:

60 a) co-cultivar una agrupación de los linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo o un linfocito B de conejo individual que secreta anticuerpo depositado con células de mamífero que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL-21

b) aislar el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y aislar un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo, que se une específicamente a un antígeno,

65 c) cultivar una célula que comprende el ácido nucleico aislado en b) o una variante del mismo que codifica una

versión humanizada del dominio variable de cadena ligera y/o pesada dentro de uno o más casetes de expresión,

d) recuperar el anticuerpo desde la célula o medio de cultivo y producir en virtud de ello un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

5 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de un estimulante mitogénico y/o un estimulante de producción de anticuerpo.

En un modo de realización, el método comprende las siguientes etapas:

- 10 a) proporcionar una población de linfocitos B de conejo (maduros) que secretan anticuerpo.
b) teñir las células de la población de linfocitos B con al menos un colorante fluorescente. (En un modo de realización, con de uno a tres, o de dos a tres colorantes fluorescentes).
c) depositar las células individuales de la población de linfocitos B de conejo teñidos o una agrupación de células de la población de linfocitos B teñidos en recipientes individuales. (En un modo de realización, el recipiente es un pocillo o una placa de múltiples pocillos),
15 d) cultivar los linfocitos B individuales depositados en presencia de células de mamífero que expresan CD40L y, opcionalmente, IL-2 e IL-21,
e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B individuales,
20 f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos que se unen específicamente por PCR de transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y obteniendo en virtud de ello un dominio variable de cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico,
g) introducir el dominio variable de cadena lineal y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico o una variante del mismo que codifica una versión humanizada del dominio variable de cadena ligera y/o pesada en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,
25 h) introducir el ácido nucleico en una célula,
i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo desde la célula o el sobrenadante de cultivo de la célula para producir en virtud de ello un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

30 En un modo de realización, el método comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una población de linfocitos B de conejo (maduros) que secretan anticuerpo.
35 b) teñir las células de la población de linfocitos B de conejo con al menos un colorante fluorescente. (En un modo de realización, con de uno a tres, o de dos a tres colorantes fluorescentes).
c) depositar las células individuales de la población de linfocitos B de conejo teñidos o una agrupación de células de la población de linfocitos B de conejo teñidos en recipientes individuales. (En un modo de realización, el recipiente es un pocillo o una placa de múltiples pocillos),
40 d) cultivar los linfocitos B de conejo depositadas en presencia de células de mamífero que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL-21,
e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B de conejo,
f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos que se unen específicamente por PCR de transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y obteniendo en virtud de ello un dominio variable de cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico,
45 g) introducir el dominio variable de cadena lineal y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,
h) introducir el ácido nucleico en una célula,
i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo desde la célula o el sobrenadante de cultivo celular para producir en virtud de ello un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

50 En un modo de realización, la agrupación de células comprende entre aproximadamente 10 linfocitos B y aproximadamente 1.000.000 linfocitos B. En un modo de realización la agrupación comprende entre aproximadamente 500 linfocitos B y aproximadamente 100.000 linfocitos B. En un modo de realización, la agrupación comprende aproximadamente 500 linfocitos B.

En el presente documento se notifica el uso de una célula de mamífero que expresa CD40L humano en el co-cultivo de linfocitos B humanos que secretan anticuerpo.

60 En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula BHK.

En un modo de realización, el CD40L humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02.

65 En el presente documento se notifica el uso de SAC in el co-cultivo de linfocitos B que secretan anticuerpo y células de mamífero que expresan CD40L.

Un aspecto tal como se notifica en el presente documento, es el uso de célula BHK o célula CHO que expresa CD40L de conejo e IL-2 e IL-21 en un co-cultivo de un linfocito B de conejo.

5 En el presente documento se notifica el uso de una célula de mamífero que expresa CD40L humano, e IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 en un co-cultivo de un linfocito B humano.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

10 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

15 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es un método para co-cultivar linfocitos B de conejo que comprende la etapa de cultivar un linfocito B de conejo individual depositado o una agrupación de linfocitos B de conejo con células CHO o BHK que expresan CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización de todos los aspectos que se notifican en el presente documento la IL-2 es IL-2 humana o IL-2 de ratón y la IL-21 es IL-21 humana o IL-21 de ratón.

20 En el presente documento se notifica un método para co-cultivar linfocitos B humanos que comprende la etapa de cultivar un linfocito B humano individual depositado o una agrupación de linfocitos B humanos con células de mamífero que expresan CD40L humano en presencia de IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.

25 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

30 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es el uso de célula CHO o BHK que expresa CD40L de conejo, IL-2 e IL-21 en un co-cultivo de un linfocito B de conejo para mejorar el crecimiento celular.

35 En el presente documento se notifica el uso de una célula de mamífero que expresa CD40L humano, IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 en un co-cultivo de un linfocito B humano para mejorar el crecimiento celular.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

40 En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

45 En el presente documento se notifica un método para mejorar el crecimiento celular de linfocitos B de conejo que comprende la etapa de cultivar un linfocito B de conejo individual depositado o una agrupación de linfocitos B de conejo con células de mamífero que expresan CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización de todos los aspectos, tal como se notifica en el presente documento la IL-2 es IL-2 humana o IL-2 de ratón y la IL-21 es IL-21 humana o IL-21 de ratón.

50 En el presente documento se notifica un método para mejorar el crecimiento celular de linfocitos B humanos que comprende la etapa de cultivar un linfocito B humano individual depositado o una agrupación de linfocitos B humanos con células de mamífero que expresan CD40L en presencia de IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.

En un modo de realización, el cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

55 En un modo de realización, el cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21 e IL-6.

En un modo de realización, las interleucinas utilizadas en el co-cultivo son todas ellas interleucinas humanas.

60 Descripción detallada de la invención

El objeto que se notifica en el presente documento proporciona un método aplicable de forma general para la generación rápida, eficiente y reproducible de anticuerpos de conejo (o ser humano) partiendo de linfocitos B de conejo (o ser humano) que comprende al menos una etapa de cultivo.

65 Se ha observado que la adición de una célula de mamífero que expresa CD40L de conejo e IL-2 e IL-21 puede mejorar las características de crecimiento de linfocitos B de conejo, es decir, los linfocitos B de conejo, se puede

cultivar tanto sola célula individual depositada como una agrupación de células, de una forma más rápida, a altas densidades celulares que en ausencia de célula de mamífero que expresa CD40L de conejo e IL-2 e IL-21. Por tanto, es posible obtener altas densidades de linfocito B de conejo y, en correspondencia, altas concentraciones de IgG en el sobrenadante de cultivo en un breve período de tiempo.

En el presente documento se notifica como uno de los aspectos una célula CHO que expresa CD40L de conejo.

Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es el uso de célula CHO que expresa CD40L de conejo junto con IL-2 e IL-21 en el co-cultivo de linfocitos B de conejo.

En el presente documento se notifica una mezcla nutriente sintética que se puede utilizar en combinación con la célula CHO que expresa CD40L de conejo u otras células nutrientes para proporcionar un sistema de estimulación y cultivo de linfocitos B muy eficiente.

En el presente documento se notifica como uno de sus aspectos una célula BHK que expresa CD40L humano.

En el presente documento se notifica el uso de una célula BHK que expresa CD40L humano junto con IL-2 e/o IL-21 en el co-cultivo de linfocitos B humanos.

En el presente documento se notifica una mezcla nutriente sintética que se puede utilizar en combinación con la célula BHK que expresa CD40L humano u otras células nutrientes para proporcionar un sistema de estimulación y cultivo de linfocitos B muy eficiente.

Los métodos y técnicas conocidos entre las personas especializadas en la técnica y que son útiles para llevar a cabo la presente invención se describen p.ej. en Ausubel, F.M., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volúmenes I a III (1997), Wiley and Sons; Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

Definiciones

Un "armazón humano aceptor" para los fines del presente documento es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón del dominio variable de cadena ligera (VL) o un armazón del dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un armazón de inmunoglobulina humana o un armazón de consenso humano, tal como se define más adelante. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o un armazón de consenso humano puede comprender su misma secuencia de aminoácidos o puede incluir cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos modos de realización el armazón humano aceptor VL tiene una secuencia idéntica a la del armazón de inmunoglobulina humana VL o la secuencia del armazón de consenso humano.

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las regiones hipervariables (RHV), en comparación con el anticuerpo precursor que no posee dichas alteraciones, teniendo como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere al grupo de carboxi α -aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico, directamente o en forma de precursor. Los aminoácidos individuales son codificados por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, denominados codones o tripletes base. Cada aminoácido es codificado por al menos un codón. La codificación del mismo aminoácido por diferentes codones se conoce por "degeneración del código genético". El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a carboxi α -aminoácidos naturales y comprende alanina (código de tres letras: ala, de una letra A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse solo a ellas, anticuerpo monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p.ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que compone una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, pero sin limitarse solo a ellos Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (p.ej. scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de los fragmentos de anticuerpo.

El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie en particular, al mismo tiempo que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

5 La “clase” de anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee la cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), p.ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente

10 El término “clon” se refiere a una población de linfocitos B en división y secretadores de anticuerpos que emergen/se originan desde un linfocito B individual. Por tanto, un clon de linfocito B produce un anticuerpo monoclonal.

El término “expresión” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a los procesos de transcripción y/o traducción que tienen lugar en una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula se puede determinar en función de la cantidad del ARNm correspondiente presente en la célula. Se puede cuantificar por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés por RT-PCR o por hibridación de Northern (véase Sambrook, *et al.*, 1989, supra). Se puede cuantificar los polipéptidos codificados por un ácido nucleico de interés a través de diversos métodos, p.ej. por ELISA, determinando la actividad biológica del polipéptido o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como transferencia de Western o radioinmunoensayo, utilizando inmunoglobulinas que reconozcan y se unan al polipéptido (véase Sambrook, *et al.*, 1989, supra).

Un “casete de expresión” se refiere a un constructo que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como un promotor y un sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

25 La expresión de un gen se lleva a cabo como expresión transitoria o permanente. El (los) polipéptido(s) de interés son por lo general polipéptidos secretados y por lo tanto contienen una extensión N-terminal (también conocida como secuencia señal), que es necesaria para el transporte/secreción del polipéptido a través de la pared celular al medio extracelular. En general, la secuencia señal se puede derivar de cualquier gen que codifique un polipéptido secretado. Si se utiliza una secuencia de señal heteróloga, preferiblemente, es una secuencia de señal reconocida y procesada (es decir, segmentada por una señal peptidasa) por la célula hospedadora. Para la secreción en levadura, por ejemplo, se puede sustituir la secuencia señal nativa de un gen heterólogo que se va a expresar por una secuencia señal de levadura homóloga derivada de un gen secretado, como por ejemplo la secuencia señal invertasa de levadura, líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, y *Hansenula*; el segundo está descrito en el documento US 5.010.182), secuencia señal de fosfatasa ácida o la secuencia señal de glucoamilasa de *C. albicans* (patente europea (EP 0 362 179)). En la expresión de la célula de mamífero la secuencia señal nativa de la proteína de interés es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamífero, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionada, p.ej. inmunoglobulinas de origen humano o murino, así como secuencias señal secretora virales, p.ej. secuencia señal de glicoproteína D de herpes simple. El fragmento de ADN que codifica para dicho pre-segmento está ligado en fase, es decir, unido operativamente al fragmento de ADN que codifica un polipéptido de interés.

El término “animal experimental” se refiere a un animal no humano. En un modo de realización, el animal experimental se selecciona de rata, ratón, hámster, conejo, camello, llama, primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollo, anfibios, tiburones y reptiles. En un modo de realización, el animal experimental es un mamífero.

El término “región Fc” se utiliza en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En un modo de realización, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el término carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, puede estar presente o no la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc. A no ser que se especifique en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácido en la región Fc o la región constante se corresponde con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH 91-3242, Vols. 1-3.

El término “mezcla nutriente” se refiere a una combinación de diferentes aditivos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o otras proteínas que promueven la activación y/o supervivencia de linfocitos B y/o secreción de anticuerpo. La mezcla nutriente puede ser una mezcla nutriente natural, p.ej. obtenida a partir del sobrenadante de cultivo de timocitos (SNT), que es una combinación no definida de citocinas, o puede consistir en una mezcla nutriente sintética, p.ej., que consiste en una mezcla de IL-21 y/o IL-2 y/o IL-6.

El “armazón” o “FR” se refiere a restos del dominio variable distintos a los restos de la región hipervariable (RHV). El FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, la RHV y las secuencias FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

El término “célula” o “célula hospedadora” se refiere a una célula en la que puede estar o en la que se transfecta un ácido nucleico, p.ej. que codifica un polipéptido heterólogo. El término “célula” incluye tanto células procariotas, que se utilizan para propagación de plásmidos, como células eucariotas, que se utilizan para la expresión de un ácido nucleico y producción del polipéptido codificado. En un modo de realización, las células eucariotas son células de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO, opcionalmente una célula CHO K1 (ATCC CCL-61 o DSM ACC 110), o una célula CHO DG44 (también conocida como CHO-DHFR[-], DSM ACC 126), o una célula CHO XL99, una célula T-CHO (véase p.ej. Morgan, D., *et al.*, *Biochemistry* 26 (1987) 2959-2963), o una célula S- CHO o una célula Super-CHO (Pak, S.C.O., *et al.* *Cytotechnol.* 22 (1996) 139-146). Si estas células no se adaptan para crecer en medio sin suero o en suspensión, ha de realizarse una adaptación previamente a su uso en el presente método. Tal como se utiliza en el presente documento, la palabra “célula” incluye la célula objeto y su descendencia. Por tanto, las expresiones “transformante” y “células transformada” incluyen la célula primaria objeto y los cultivos derivados de ella independientemente del número de transferencias o subcultivos. Se entiende asimismo que la descendencia no tiene por qué ser precisamente idéntica en su contenido de ADN en su totalidad, como consecuencia de mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia variante que tenga la misma función o actividad biológica que la célula transformada original, según la exploración.

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que se deriva de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias que codifican anticuerpo humano. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un “armazón de consenso humano” es un armazón que representa los restos de aminoácido que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias de armazón VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de las secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como el descrito en Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. En un modo de realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I tal como se describe en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización para la VH, el subgrupo es un subgrupo III tal como se describe en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácido de RHV no humanas y restos de aminoácido de FR humanos. En ciertos modos de realización, un anticuerpo humanizado se compondrá sustancialmente de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las RHV (p.ej., CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todos los FR se corresponden con los de un anticuerpo humano. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, p.ej. un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

El término “región hipervariable” o “RHV”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente (“bucles hipervariables”). Por lo general los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis RHV; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). La RHV comprenden por lo general restos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), siendo ésta última de la variabilidad de secuencia más alta y/o relacionada con el reconocimiento de antígeno. En los restos de aminoácido de bucles hipervariables 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) aparecen ejemplos de bucles hipervariables (Chothia, C. y Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917). En los restos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 de H3 aparecen ejemplos de CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3). (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH 91-3242, Vols. 1-3.). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden generalmente los restos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “estos determinantes de especificidad” o “SDR” que son restos que entran en contacto con el antígeno. Las SDR están contenidas dentro de las regiones de las CDR denominadas de forma abreviada CDR o a-CDR. En los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2, y 95-102 de H3 aparecen ejemplos de a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, y a-CDR-H3) (Véase Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633). A no ser que se indique de otro modo, los restos de la RHV y otros restos del dominio variable (p.ej. restos de FR) se enumeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

El término “marcado” se refiere a la presencia o ausencia de un marcador de superficie que se puede determinar por la adición de un anticuerpo marcador anti-superficie de unión específica y marcado. Por lo tanto, la presencia de un marcador de superficie se determina p.ej. en el caso de un marcador de fluorescencia por la aparición de una fluorescencia, al tiempo que la ausencia de un marcador de superficie se determina por la ausencia de una fluorescencia tras la incubación con el anticuerpo marcador anti-superficie marcado y de unión específica.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para los posibles anticuerpos variantes, p.ej. que contienen mutaciones naturales o que se emergen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes por lo general en cantidades menores. En contraposición a las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante de un antígeno. Por lo tanto, el modificante "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtiene desde una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo a través de ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención se pueden generar a través de diversas técnicas, entre las que se incluyen, sin limitarse solo a ellas el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación sobre fagos y métodos en los que se utilizan animales transgénicos que contienen todos los loci de inmunoglobulina humana, describiéndose dichos métodos y otros métodos ilustrativos para generar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

"Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina naturales de diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. De N al término C, cada cadena tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). De manera similar, de N- al término C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio constante ligero (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ) en función de la secuencia de aminoácido de su dominio constante.

Un "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos", términos que se utilizan indistintamente en la presente solicitud, se refiere a una molécula polimérica que consiste en nucleótidos individuales (también llamadas bases) a, c, g, y t (o u en ARN), por ejemplo para ADN, ARN, o sus modificaciones. Dicha molécula de polinucleótido puede consistir en una molécula de polinucleótido natural o una molécula de polinucleótido sintética o una combinación de un polinucleótido natural y una molécula de polinucleótido sintético. Esta definición abarca asimismo las moléculas de polinucleótido naturales en las que están cambiados (p.ej. por mutagénesis), suprimidos o añadidos uno o más nucleótidos. Un ácido nucleico puede estar aislado o integrado en otro ácido nucleico, p.ej. en un casete de expresión, un plásmido o el cromosoma de una célula hospedadora. Un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos que consiste en nucleótidos individuales.

Las personas especializadas en los métodos y métodos de la técnica sabrán perfectamente cómo convertir una secuencia de aminoácidos, p.ej. un polipéptido, en la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicha secuencia de aminoácidos. Así pues, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos que consiste en nucleótidos individuales e igualmente por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificada por ella.

La expresión "unión específica" y los equivalentes gramaticales de la misma significa que el anticuerpo se une a su diana con una constante de disociación (Kd) de 10^{-7} M o menos; en un modo de realización, entre 10^{-8} M y 10^{-13} M, en otro modo de realización más, entre 10^{-9} M y 10^{-13} M. Esta expresión se utiliza además para indicar que el anticuerpo no se une específicamente a otras biomoléculas presentes, es decir, se une a otras biomoléculas con una constante de disociación (Kd) de 10^{-6} M o más, en un modo de realización entre 10^{-6} M y 1 M.

Un "vector de transfección" es un ácido nucleico (también designado molécula de ácido nucleico) que proporciona todos los elementos necesarios para la expresión de los ácidos nucleicos/gen(es) estructural(es) de codificación comprendidos en el vector de transfección en una célula hospedadora. Un vector de transfección comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, p.ej. para *E. coli*, que comprende a su vez un origen de replicación procariota, y un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariota, comprende además el vector de transfección, uno o más ácido(s) nucleico(s) que confieren resistencia a un agente de selección eucariota, y uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés. Preferiblemente, los ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección y el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifican un polipéptido de interés se ubican cada uno de ellos dentro de un casete de expresión, en virtud de lo cual cada casete de expresión comprende un promotor, un ácido nucleico de codificación y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión del gen queda bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen estructural está "unido operativamente" al promotor. De forma similar, se unen operativamente un elemento regulador y un promotor de núcleo cuando el elemento regulador modula la actividad del promotor núcleo.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen por lo general estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones de armazón conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (RHV). (Véase, p.ej., Kindt,

5 T.J., *et al.*, Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman y Co., N.Y. (2007), página 91). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Asimismo, se pueden aislar los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para rastrear una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, p.ej., Portolano, S., *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

10 El término “vector”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se une. El término incluye el vector como estructura de ácido nucleico auto-replicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

15 La expresión “animal joven” se refiere a un animal antes de que haya tenido lugar la madurez sexual. Un hámster joven, por ejemplo, tiene una edad de menos de 6 semanas, especialmente menos de 4 semanas. Un ratón joven, por ejemplo, tiene una edad de menos de 8 semanas, especialmente menos de 5 semanas.

Inmunización

20 En los métodos que se notifican en el presente documento, se pueden utilizar/procesar linfocitos B obtenidos p.ej. de ratón, rata, hámster, conejo o ser humano.

El ratón puede ser un ratón NMRI o un ratón balb/c.

25 El hámster se puede seleccionar entre un hámster armenio (*Cricetulus migratorius*), un hámster chino (*Cricetulus griseus*), y un hámster sirio (*Mesocricetulus auratus*). El hámster puede ser un hámster armenio.

30 En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B de conejo. En un modo de realización, el conejo se selecciona entre Conejos blancos neozelandeses (NZW), conejos de Zimmermann (ZIKA), conejos de la cepa mutante Alicia, conejos de cepa mutante basilea, conejos transgénicos con un locus de inmunoglobulina humana, conejos nulos para rblgM y cruces de los mismos. En un modo de realización, el linfocito B de conejo se obtiene de un conejo inmunizado o de un conejo vacunado contra un antígeno específico.

35 El linfocito B puede ser un linfocito B humano. El linfocito B humano se puede obtener de un ser humano no vacunado, sano, o de un ser humano vacunado contra un antígeno específico, o de un ser humano que tiene una enfermedad, o de un ser humano que ha sobrevivido a una enfermedad. La vacuna puede consistir en la administración de una vacuna específica para el ser humano o en la supervivencia a una enfermedad específica.

Fuente y aislamiento de linfocitos B

40 La sangre de un animal experimental inmunizado o de un ser humano vacunado proporciona una gran diversidad de linfocitos B que producen anticuerpo. Los linfocitos B obtenidas de estas fuentes secretan anticuerpos que, prácticamente no tienen secuencias de aminoácido idénticas ni se solapan dentro de las CDR y, por tanto, presentan una gran diversidad.

45 En un modo de realización, los linfocitos B de un animal experimental, p.ej. obtenidos de la sangre de un animal experimental, o de un ser humano, se obtienen entre 4 días después de la inmunización y hasta 15 días después de la inmunización o el refuerzo más reciente.

50 En un modo de realización, los linfocitos B se obtienen después de entre 4 días y hasta 9 días como máximo tras la inmunización o el refuerzo más reciente.

55 Este lapso de tiempo permite una mayor flexibilidad en el método, tal como se notifica en el presente documento. En este lapso de tiempo es probable que los linfocitos B que proporcionan los anticuerpos más afines se desplacen desde el bazo a la sangre (véase p.ej. Paus, D., *et al.*, JEM 203 (2006) 1081-1091; Smith, K.G.S., *et al.*, The EMBO J. 16 (1997) 2996-3006; Wrammert, J., *et al.*, Nature 453 (2008) 667-672).

Etapas de selección previas al co-cultivo

60 Los linfocitos B que producen anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno se pueden enriquecer desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por lo tanto, en un modo de realización de todos los métodos tal como se notifica en el presente documento, el linfocito B se obtiene de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o se enriquece la agrupación de linfocitos B de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

65 Las células que no producen un anticuerpo que se une al antígeno de interés o, igualmente, las células que producen un anticuerpo que se une al antígeno de interés, se pueden reducir o enriquecer, respectivamente,

empleando un enfoque de selección. En él, se presenta un socio de unión unido a una superficie y las células que se unen a él se enriquecen selectivamente en la población de células en caso de que se procesen posteriormente las células unidas o se reduzcan en la población de células en caso de que se procesen posteriormente las células que permanecen en solución.

5 El método que se notifica en el presente documento comprende, en un modo de realización, una etapa de selección en la que se seleccionan linfocitos B que producen anticuerpos específicos en función de los marcadores de superficie de la célula y la clasificación/gatillado. En un modo de realización, se clasifican/enriquecen/seleccionan linfocitos B maduras. Para la selección de linfocitos B de diferentes especies animales experimentales, se pueden utilizar diferentes marcadores de superficie de la célula.

10 Con el marcado de poblaciones de células no diana y linfocitos que no se unen específicamente, es posible empobrecer selectivamente estas células. En dicha etapa de empobrecimiento, por lo general, no se puede conseguir un empobrecimiento total. Aunque el agotamiento no es cuantitativo, supone una ventaja en el sucesivo marcado fluorescente, ya que se puede reducir o incluso minimizar el número de células que interfieren.

15 Se pueden marcar las diferentes poblaciones de células utilizando diferentes marcadores de superficie, como células CD3⁺ (linfocitos T), células CD19⁺ (linfocitos B en general), células IgM⁺ (linfocitos B maduros nativos), células IgG⁺ (linfocitos B maduros), células CD38⁺ (p.ej. plasmablastos) y células IgG⁺CD38⁺ (células pre-plasma).

20 En los métodos, tal como se notifica en el presente documento, se puede utilizar un marcado de inmunofluorescencia para la selección de linfocitos B IgG⁺ maduras, como por ejemplo linfocitos B de memoria, plasmablastos y células plasmáticas.

25 Para una selección o enriquecimiento de linfocitos B, se marcan las células con un marcado simple o un marcado doble o un marcado triple.

30 Es necesario llevar a cabo un marcado que tenga como resultado un marcado de aproximadamente 0,1 % a 2,5 % de la población total de células.

35 En un modo de realización, los linfocitos B se seleccionan por el marcado de las moléculas de superficie presentes en un 0,1 % a un 2,5 % de los linfocitos B en la población. En un modo de realización, los linfocitos B se seleccionan por el marcado de las moléculas de superficie en un 0,3% a un 1,5 % de los linfocitos B de la población. En un modo de realización, los linfocitos B se seleccionan por el marcado de las moléculas de superficie presentes en un 0,5 % a un 1 % de los linfocitos B de la población.

Depósito único

40 Los métodos, tal como se notifican en el presente documento, en un modo de realización, comprenden la etapa de depositar los linfocitos B de una población de linfocitos B como células individuales.

En un modo de realización, el depósito de células individuales se realiza por separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

45 En un modo de realización, los linfocitos B marcados específicamente se depositan como células individuales. En un modo de realización, el marcado es un marcado con marcadores de superficie con anticuerpos marcados con fluorescente.

50 En un modo de realización, los métodos, tal como se notifican en el presente documento, proporcionan anticuerpos monoclonales.

En un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifica en el presente documento el linfocito B es un linfocito B maduro y los linfocitos B maduros se depositan como células individuales.

55 El marcado inmuno fluorescente utilizado para los linfocitos B obtenidos de la sangre de un animal experimental se puede utilizar también para marcar linfocitos B obtenidos del bazo y otros órganos inmunológicos de un animal experimental, como ratón, rata, hámster o conejo.

Depósito de células múltiples

60 Los métodos, tal como se notifica en el presente documento, en un modo de realización, comprenden la etapa de depósito de una agrupación de linfocitos B. En dicha agrupación de linfocitos B se deposita un número total de linfocitos B por pocillo tras el aislamiento con perla magnética de afinidad o FACS desde sangre periférica.

65 En un modo de realización, se depositan aproximadamente 500 linfocitos B.

En un modo de realización, se depositan aproximadamente 2.500 linfocitos B.

El número total de linfocitos B depositados puede aumentar, p.ej. para linfocitos B humanos, hasta 90.000 linfocitos B o más en un solo experimento.

5

Co-cultivo

En el presente documento se notifica el co-cultivo de linfocitos B que producen anticuerpo y células de mamífero que expresan CD40L, como células CHO o BHK.

10

Por tanto, en un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifica en el presente documento; se co-cultivan los linfocitos B, ya sea depositados como una agrupación de linfocitos B o como linfocitos B individuales, con células CHO que expresan CD40L en presencia de IL-2 e IL-21 o una mezcla nutriente.

15

Al cabo de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, o 21 días, especialmente al cabo de 3, 4 o 5 días (agrupación de aproximadamente 2.500 linfocitos B), o especialmente al cabo de 6, 7 u 8 días (linfocito B depositado individual o agrupación de aproximadamente 500 linfocitos B) de co-cultivo, se pueden obtener ya suficientes moléculas de anticuerpo en el sobrenadante. Con la cantidad de anticuerpos obtenida de este modo, se pueden realizar diferentes análisis con el fin de caracterizar el anticuerpo, p.ej. en lo que respecta a la especificidad de unión, con más detalle.

20

Con una caracterización del anticuerpo mejorada en esta fase más temprana en el proceso de exploración /selección, es posible reducir el número de aislados de ácido nucleico requeridos y las reacciones de secuenciación que han de realizarse.

25

Un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifica en el presente documento, es el co-cultivo de linfocitos B que producen anticuerpo y células CHO que expresan CD40L en presencia de una mezcla nutriente.

La mezcla nutriente puede ser una mezcla nutriente natural o una mezcla nutriente sintética.

30

Una mezcla nutriente natural es p.ej. sobrenadante de timocitos (SNT). Aunque contiene factores solubles apropiados, este reactivo es heterogéneo, los ingredientes no están descritos adecuadamente y difiere de un animal a otro.

35

Una mezcla nutriente sintética es la denominada "mezcla nutriente Zubler ". Consiste en una combinación definida de citocinas murinas (2 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml IL-2, 10 ng/ml IL-10, y 2 ng/ml TNF α).

40

En un modo de realización de todos los métodos tal como se notifican en el presente documento, la mezcla nutriente es un sobrenadante de cultivo de timocito. En un modo de realización, el linfocito B no es un linfocito B humano.

45

En un modo de realización, el sobrenadante de cultivo de timocito se obtiene a partir del cultivo de timocitos de la glándula timo del correspondiente animal joven. Es especialmente adecuada para su uso la glándula timo de animales jóvenes en comparación con el aislamiento de timocitos de la sangre de animales adultos.

50

En un modo de realización, el sobrenadante de cultivo de timocito se obtiene a partir del cultivo de linfocitos T humanos obtenidos de sangre de un ser humano.

55

En general, la etapa de co-cultivo de linfocitos B con células CHO que expresan CD40L en los métodos, tal como se notifican en el presente documento, puede ir precedida y también seguida de una serie de etapas adicionales.

60

Se ha observado que es posible utilizar el co-cultivo de células CHO que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL-21 y SAC para activar linfocitos B tempranos de conejo (no maduros o inmaduros). Dichos linfocitos B no expresan CD138.

65

En un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifica en el presente documento, el co-cultivo de linfocitos B que producen anticuerpo y células CHO que expresan CD40L es en presencia de IL-2 e IL-21. En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B de conejo y el CD40L es CD40L de conejo. En un modo de realización, el medio de cultivo está esencialmente libre de IL-4, es decir, no se añade IL-4 al medio de cultivo. En un modo de realización, se añaden IL-2 e IL-21 al comienzo del cultivo junto con el medio de cultivo.

70

En un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifican en el presente documento, el co-cultivo de los linfocitos B de conejo que producen anticuerpo y las células CHO que expresan CD40L de conejo es en presencia de IL-2 e IL-21, por lo cual el medio de cultivo carece esencialmente de IL-4, y por lo cual se añaden IL-2 e IL-21 al comienzo del cultivo junto con el medio de cultivo.

75

Se ha observado que el uso de un sistema de co-cultivo que comprende un linfocito B, una célula de mamífero que expresa CD40L, IL-2 e IL-21 tiene como resultado una mejor proliferación de los linfocitos B, es decir, los linfocitos B se dividen con mayor rapidez y densidades de célula más altas y se puede obtener la titulación de anticuerpo en el

sobrenadante de cultivo, respectivamente, en menos tiempo en comparación con un sistema que no comprende una, dos o todas las IL-2, IL-21, y una célula de mamífero que expresa CD40L.

5 Se ha observado asimismo, que para linfocitos B de conejo, es especialmente adecuado un sistema de co-cultivo que comprende células CHO que expresan CD40L de conejo, IL- 2 humano o murino e IL-21 humano o murino.

Caracterización de células co-cultivadas según la producción de IgG

10 Para la determinación (cualitativa y cuantitativa) de IgG secretado después del co-cultivo, se pueden emplear por lo general todos los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica, como ELISA. En un modo de realización de todos los métodos, tal como se notifica en el presente documento, se utiliza ELISA. Para determinar los niveles de IgG humana, se ha utilizado tecnología de matriz citométrica de microesferas (CBA) (disponible por BD Biosciences).

15 Dependiendo de los resultados de caracterización, se puede obtener, es decir, seleccionar un clon de linfocito B.

Caracterización de células co-cultivadas por expansión y proliferación

20 Para la determinación (cuantitativa y cualitativa) de la expansión celular, se puede evaluar la proliferación o viabilidad de los linfocitos B co-cultivados empleando diferentes sistemas de lectura (ensayo de la actividad celular comercial, ensayo de viabilidad celular luminiscente "cell titer glow" (Promega), el método de dilución de CFSE, incorporación de ³HThymidin o imágenes de cultivos celulares).

Aislamiento de ARNm, clonación y secuenciación

25 Un clon de linfocito B que produce altas titulaciones de anticuerpo proporciona una cantidad de ARNm que codifica la región variable de cadena ligera y pesada monoclonal (afín) que permite el uso de cebador de PCR degenerado y evita la necesidad de un cebador de PCR altamente específico. Asimismo, se reduce el número de ciclos de PCR necesario. Por tanto, en un modo de realización, la PCR con transcriptasa inversa es con un cebador de PCR degenerado para el dominio variable de cadena ligera y pesada.

30

Desde los linfocitos B, se puede aislar y transcribir el ARNm total y transcribir en ADNc. Con el cebador correspondiente, se puede amplificar la región VH y VL afín que codifica el ácido nucleico.

35 En un modo de realización de todos los métodos tal como se notifica en el presente documento, la secuencia de aminoácido se deriva del ácido nucleico que codifica el dominio variable amplificado. El inicio y final exactos del ácido nucleico que codifica el dominio variable se identifica localizando las secuencias de aminoácidos de EVQL/QVQL a VSS (región VH) y DIVM/DIQM a KLEIK (región VL).

En el presente documento se notifica

40 En el presente documento se notifica la co-estimulación de linfocitos B que secretan anticuerpo (i) a través de la vía CD40/CD40L (CD154) utilizando células de mamífero irradiadas, p.ej. CHO (ovario de hámster chino) o BHK (riñón de hámster recién nacido), células nutrientes transfectadas con CD40L, p.ej. de origen de conejo o de origen humano, y (ii) a través de la suplementación del medio de cultivo con citocinas individuales o una mezcla nutriente que comprende p.ej. interleucina humana o de ratón 2 (IL-2) y 21 (IL-21), y/o partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC) fijadas con formalina y termo-eliminadas.

45

Aspectos y modos de realización de la presente invención

50 Un aspecto, tal como se notifica en el presente documento es un método para producir un anticuerpo que comprende la etapa de co-cultivar un linfocito B de conejo con célula CHO o BHK que expresa CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21.

55 Con la etapa de co-cultivo de los linfocitos B de conejo (células depositadas individuales o como una agrupación de células) con una célula de mamífero, p.ej., presentadoras de superficie celular, que expresan un CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21, se proporciona un método rápido, eficaz y reproducible para la generación de anticuerpos de conejo o humanos a partir de linfocitos B de conejo.

60 En un modo de realización, el linfocito B de conejo es un linfocito B de conejo nativo o un linfocito B de conejo no maduro.

En un modo de realización, el linfocito B de conejo es un linfocito B IgG⁺

65 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana. En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina.

- En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 humana. En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 murina.
- En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 murina.
- 5 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 murina.
- En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 humana.
- 10 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 humana.
- En un modo de realización, el cultivo se realiza en ausencia de IL-4. En un modo de realización, el medio de cultivo carece de IL-4.
- 15 En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino.
- En un modo de realización, el CD40L de conejo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.
- En un modo de realización, los linfocitos B de conejo se obtienen transcurridos de 4 a 9 días tras la inmunización o refuerzo del conejo con el antígeno.
- 20 En un modo de realización, el método comprende además una o más de las siguientes etapas:
- obtención de linfocitos B de un conejo inmunizado, y/o
 - depósito de linfocitos B individuales, y/o
 - 25 - co-cultivo de los linfocitos B con una célula CHO o BHK que expresa un CD40L de conejo, y/o
 - obtención del ácido nucleico que codifica dominios variables del anticuerpo de conejo desde los linfocitos B de conejo c-cultivados, y/o
 - humanización de los dominios variables del anticuerpo de conejo, y/o
 - 30 - cultivo de una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica los dominios variables del anticuerpo y recuperación del anticuerpo desde la célula o el medio de cultivo.
- En el presente documento se notifica un método para producir un anticuerpo que comprende la etapa de co-cultivar un linfocito B humano con una célula de mamífero que expresa un CD40L humano.
- 35 Con la etapa de co-cultivo de linfocitos B humanos (célula individual depositada o agrupación de células) con células de mamífero que expresa CD40L humano, p.ej. de presentación de superficie celular, se proporciona un método eficiente y reproducible para la generación de anticuerpos humanos a partir de linfocitos B humanos.
- En un modo de realización, el linfocito B humano se obtiene de la sangre de un ser humano.
- 40 En un modo de realización, el linfocito B de conejo es un linfocito B IgG⁺.
- En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster recién nacido.
- 45 En un modo de realización, se añade(n) IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 al co-cultivo.
- En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana.
- En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 humana.
- 50 En un modo de realización, la IL-6 es IL-6 humana.
- En un modo de realización, el cultivo se realiza en ausencia de IL-4. En un modo de realización, el medio de cultivo carece de IL-4.
- 55 En un modo de realización, el CD40L humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02.
- En un modo de realización, los linfocitos B se obtienen transcurridos de 4 a 9 días tras la inmunización del ser humano con el antígeno o una vacuna.
- 60 En un modo de realización, el método comprende además una o más de las siguientes etapas:
- obtención de linfocitos B de la sangre de un ser humano inmunizado, o vacunado o que tiene una enfermedad o que ha sobrevivido a una enfermedad y/o
 - 65 - depósito de linfocitos B individuales, y/o
 - co-cultivo de los linfocitos B con una a célula de mamífero que expresa CD40L humano, y/o

- obtención del ácido nucleico que codifica los dominios variables del anticuerpo humano desde los linfocitos B humanos co-cultivados, y/o
- cultivo de una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica los dominios variables del anticuerpo humano y, opcionalmente, un ácido nucleico que codifica la región constante de un anticuerpo humano, y recuperación del anticuerpo desde la célula o el medio de cultivo.

En el presente documento se notifica el uso de IL-2 e IL-21 para el co-cultivo de linfocitos B con células nutrientes.

La adición de IL-2 e IL-21 al co-cultivo de un linfocito B con la célula nutriente proporciona una estimulación de linfocito B muy eficiente y mejores características de crecimiento, tales como una mejor velocidad de crecimiento y/o secreción de anticuerpo.

En un modo de realización, la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L.

En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B de conejo y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L de conejo. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino.

En el presente documento se notifica el uso de IL-2 y/o IL-21 para el co-cultivo de linfocitos B con células nutrientes.

La adición de IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 al co-cultivo de un linfocito B con una célula nutriente proporciona una estimulación de linfocito B muy eficiente y mejores características de crecimiento, tales como un mejor de crecimiento y/o secreción de anticuerpo.

En un modo de realización, la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L.

En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B humano y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L humano. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster recién nacido.

Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento es un método para producir un anticuerpo que comprende la etapa de co-cultivar un linfocito B con células nutrientes e IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L.

En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B de conejo y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L de conejo. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino.

En el presente documento se notifica un método para producir un anticuerpo que comprende la etapa de co-cultivar un linfocito B con células nutrientes e IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6.

En un modo de realización, la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L.

En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B humano y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L humano. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster recién nacido.

En el presente documento se notifica un kit que comprende células CHO que expresan CD40L de conejo, IL-2 e IL-21.

En el presente documento se notifica un kit que comprende células BHK que expresan CD40L humano e IL-2 o IL-21 o IL-6 o una combinación de las mismas.

En el presente documento se notifica un método para cultivar un linfocito B que secreta un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie de linfocito T y que sirve de mediador de un estímulo negativo para linfocito T, que comprende el co-cultivo del linfocito B y una célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de IL-2 o IL-21 o ambas.

Dicho sistema de co-cultivo es útil si se ha amplificado un linfocito B, que está secretando un compuesto de inhibición de linfocitos T, partiendo de un linfocito B individual o agrupado y células nutrientes derivadas de linfocitos T, p.ej., no se pueden utilizar células de timoma, ya que el compuesto de inhibición de linfocitos T secretado reduciría o eliminaría el efecto de la célula nutriente.

Las células CHO que expresan CD40L, tal como se notifica en el presente documento se pueden utilizar para generar anticuerpos específicos de linfocito T. El uso de un sistema nutriente que consiste en linfocitos T o que

comprende antígenos de linfocitos T, como por ejemplo la línea de células de timoma EL4-B5 no es adecuado, ya que los anticuerpos específicos de linfocito T producidos por los linfocitos B interferirían en el sistema de cultivo. Para cultivar linfocitos (B) que secretan anticuerpo específico de linfocito T, lo ideal sería un sistema independiente de linfocitos T, como por ejemplo, un sistema como el que se notifica en el presente documento.

5 En un modo de realización, el antígeno no es CD40L.

En un modo de realización, el compuesto de inhibición de linfocito T es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de superficie de linfocito T.

10 En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B de conejo y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L de conejo. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino.

15 En un modo de realización, se añaden IL-2 e IL-21 al co-cultivo.

En un modo de realización, el linfocito B es un linfocito B humano y la célula nutriente es una célula de mamífero que expresa CD40L humano. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster recién nacido.

20 En un modo de realización, se añade(n) IL-2 e/o IL-21 e/o IL-6 al co-cultivo.

En el presente documento se notifica un método para el cultivo de un linfocito B que secreta anticuerpo que comprende en el siguiente orden:

- 25 i) un primero co-cultivo del linfocito B y una célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante mitogénico, y
ii) un posterior segundo co-cultivo del linfocito B y la célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante de producción de anticuerpo.

30 Con el cultivo secuencial de un linfocito B primero en presencia de un estimulante mitogénico y, a continuación, en presencia de un estimulante de producción de anticuerpo, se separa el co-cultivo del linfocito B en una primera fase en la que se amplifica el linfocito B y en una segunda fase en la que se induce la secreción del anticuerpo.

35 En un modo de realización, el primer y segundo co-cultivo se lleva a cabo en el mismo vaso de cultivo.

En un modo de realización, el método para el cultivo de linfocitos B que secretan anticuerpos comprende un co-cultivo del linfocito B y una célula de mamífero que expresa CD40L según lo cual se añade un primer estimulante mitogénico al cultivo y, a continuación, se añade un estimulante de producción de anticuerpo al cultivo.

40 En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo al menos una hora después de añadir el estimulante mitogénico. En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo de uno a tres días después de añadir el estimulante mitogénico al cultivo.

45 En un modo de realización, el estimulante mitogénico se selecciona del grupo que comprende CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-14, Interleucina-21, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ), anticuerpos anti-IgG de unión cruzada, anticuerpos anti-CD20 de unión cruzada, y/o anticuerpos anti-CD27 de unión cruzada.

50 En un modo de realización, el estimulante de producción de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-14, Interleucina-21, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ).

55 La activación de linfocito B también podría inducirse a través de anticuerpos anti-IgG, anti-CD20, y/o anti-CD27, anticuerpos anti-IgG de unión cruzada, anticuerpos anti-CD20 de unión cruzada, y/o anticuerpos anti-CD27 de unión cruzada.

60 En un modo de realización, se añade el estimulante mitogénico 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después del comienzo del primero co-cultivo.

65

En un modo de realización, se añade el estimulante de producción de anticuerpo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días después de la adición del estimulante mitogénico.

5 En un modo de realización, cada uno de los cultivos se realiza durante 5 a 14 días.

En un modo de realización, el cultivo se realiza durante un período total comprendido entre 5 y 21 días. En un modo de realización, el cultivo se realiza durante un período total comprendido entre 6 y 14 días.

10 En un modo de realización, se retira el estimulante mitogénico antes del inicio del segundo co-cultivo. En un modo de realización, se retira cambiando el sobrenadante de cultivo y/o lavando las células con un medio neutro.

Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es un método para producir un anticuerpo, que se une específicamente a un antígeno, que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) co-cultivo de un linfocito B individual o agrupación de linfocitos depositados que secretan anticuerpo con una célula de mamífero que expresa CD40L,
 b) cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica las regiones variables, o una variante del mismo, del anticuerpo secretado por el linfocito B co-cultivado en la etapa a) dentro de uno o más casetes de expresión,
 20 c) recuperación del anticuerpo desde la célula o el medio de cultivo produciendo en virtud de ello un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

25 En un modo de realización, el co-cultivo es en presencia de un estimulante mitogénico y/o un estimulante de producción de anticuerpo.

En un modo de realización, el primero y/o segundo co-cultivo es en presencia de IL-2 e IL-21.

En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana. En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina.

30 En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 humana. En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 murina.

En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 murina.

35 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 murina.

En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 humana.

En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 humana.

40 En un modo de realización, el cultivo se realiza en ausencia de IL-4. En un modo de realización, el medio de cultivo carece de IL-4.

Un modo de realización comprende el co-cultivo de

- 45 i) un primer co-cultivo del linfocito B y una célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante mitogénico, y
 ii) un posterior segundo co-cultivo del linfocito B y la célula de mamífero que expresa CD40L en presencia de un estimulante de producción de anticuerpo.

50 En un modo de realización, el método comprende la siguiente etapa:

- ab) aislar un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y aislar un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

55 En un modo de realización, el método comprende las siguientes etapas:

- 60 a) proporcionar una población de linfocitos B (maduros) que secretan anticuerpo,
 b) teñir las células de la población de linfocitos B con al menos un colorante fluorescente.
 c) depositar las células individuales de la población de linfocitos B en recipientes individuales.
 d) cultivar los linfocitos B depositados en presencia de célula de mamífero que expresa CD40L e IL-2 e IL-21,
 e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos secretados en el cultivo de los linfocitos B individuales,
 f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos que se unen específicamente por PCR con transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y obteniendo así un
 65 dominio variable de cadena ligera y pesada de anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico,
 g) introducir el dominio variable de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico

en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,
 h) introducir el ácido nucleico en una célula,
 i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo desde la célula o el sobrenadante de cultivo de la célula para producir así un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.

- 5 En un modo de realización, los linfocitos B se obtienen de la sangre de un animal o un ser humano.
- En un modo de realización, el tinte es con uno a tres o de dos a tres colorantes fluorescentes.
- 10 En un modo de realización, el recipiente es un pocillo o una placa de múltiples pocillos.
- En un modo de realización, la célula es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO o una célula BHK, o una célula NS0, o una célula Sp2/0.
- 15 Uno de los aspectos, tal como se notifica en el presente documento, es el uso de una célula CHO o una célula BHK que expresa CD40L, IL-2 e IL-21 en el co-cultivo de linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo.
- En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO.
- 20 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana. En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina.
- En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 humana. En un modo de realización, la IL-21 es IL-21 murina.
- En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 murina.
- 25 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 murina.
- En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 humana.
- 30 En un modo de realización, la IL-2 es IL-2 murina y la IL-21 es IL-21 humana.
- En un modo de realización, el cultivo se realiza en ausencia de IL-4. En un modo de realización, el cultivo carece de IL-4.
- 35 En un modo de realización, el CD40L de conejo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.
- En el presente documento se notifica el uso de una célula de mamífero que expresa CD40L humano en combinación con IL-2 y/o IL-21 y/o IL-6 en el co-cultivo de linfocitos B que secretan anticuerpo humano.
- 40 En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula BHK.
- En un modo de realización, el CD40L humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02.
- En el presente documento se notifica el uso de SAC en el co-cultivo linfocitos B que secretan anticuerpo.
- 45 En un modo de realización, el co-cultivo es con célula de mamífero que expresa CD40L y/o IL-2.
- Los Ejemplos, Figuras y secuencias que se presentan a continuación, servirán para ayudar a comprender la presente invención, cuyo alcance real se establece en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse, que es posible introducir modificaciones en los métodos expuestos sin alejarse por ello del ánimo de la presente invención.

Descripción de las Figuras

- 55 Figura 1 Proliferación de linfocitos B tras el cultivo de 2.500 linfocitos B purificados de conejo con 5.000 células CHO que expresan CD40L de conejo γ -irradiadas o células EL4-B5 durante 7 días.
- Figura 2 Imágenes de microscopía de co-cultivo de linfocitos B y células nutrientes en ausencia o presencia de diferentes estímulos tras 6 días de co-cultivo: a) células EL4-B5 y mezcla Zubler, b) células CHO que expresan rbCD40L e IL-21 humana, c) células CHO que expresan rbCD40L e IL-2 humana, d) células CHO tipo silvestre e IL-21 humana e IL-2 humana, e) células CHO que expresan rbCD40L e IL-21 humana e IL-2 humana, f) células CHO que expresan rbCD40L e IL-21 humana e IL-2 humana y SAC.
- 60 Figura 3 Se cultivaron 750 linfocitos B de memoria de IgG⁺ humanos clasificados con 5.000 células BHK que expresan CD40L γ -irradiadas y las mezclas nutrientes indicadas. Se muestra la proliferación de linfocitos B de memoria humanos aislados al cabo de 8 días.
- 65 Figura 4 Proliferación de linfocitos B humanos aislados intactos. Tras el aislamiento desde PBMC, se co-cultivaron 90.000 linfocitos humanos agrupados por pocillo con células BHK que expresan CD40L

- γ-irradiadas y las mezclas nutrientes indicadas. Se muestra la proliferación (números de células absolutos) al cabo de 7 días.
- Figura 5 Diagrama de puntos en el que se muestra la dilución de CFSE como grado de la proliferación analizada por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se muestra el teñido con CFSE (eje X) o los linfocitos B CD19⁺ gatillados (eje de las Y).
- Figura 6 Linfocitos B en grupo (cultivados sin células nutrientes) al cabo de 3 días de incubación. Imágenes de microscopía de linfocitos B humanos cultivados tres días en solitario (a) o en presencia de IL-2 humana (b) o IL-2 y SAC (c).
- Figura 7 Se co-cultivaron 500 linfocitos B IgG⁺ de conejo clasificados por pocillo con 10.000 células CHO que expresan CD40L de conejo γ-irradiadas e IL-2 e IL-21 de diferentes orígenes y combinaciones de ellas. Se muestra la titulación de anticuerpos tras 7 días en el sobrenadante de cultivo (mediana); 1: mu IL-2, 2: hu IL-2, 3: mu IL-21, 4: hu IL-21, 5: hu IL-2 y hu IL-21, 6: hu IL-2 y mu IL-21, 7: mu IL-2 y hu IL-21, 8: mu IL-2 y mu IL-21; γ-eje: rb IgG [μg/ml].
- Figura 8 Resultado del ensayo de viabilidad CTG para el co-cultivo de la Figura 7.
- Figura 9 Se co-cultivaron 500 linfocitos B IgG⁺ de conejos descongelados clasificados por pocillo con 10.000 células CHOK1 γ-irradiadas (por debajo del límite de detección) o con 10.000 células CHO que expresan CD40L de conejo γ-irradiadas e IL-2 e IL-21 de diferentes orígenes y combinaciones de ellas. Se muestra la titulación de anticuerpos tras 7 días en el sobrenadante de cultivo (mediana); 1: mu IL-2, 2: hu IL-2, 3: mu IL-21, 4: hu IL-21, 5: hu IL-2 y hu IL-21, 6: hu IL-2 y mu IL-21, 7: mu IL-2 y hu IL-21, 8: mu IL-2 y mu IL-21; γ-eje: rb IgG [μg/ml].
- Figura 10 Resultado del ensayo de viabilidad CTG para el co-cultivo de la Figura 9.
- Figura 11 Se co-cultivaron 500 Linfocitos B IgG⁺ de conejo clasificado por pocillo con 10.000 células CHO-K1 γ-irradiadas (barras a la derecha; no visible cuando está por debajo del límite de detección) o con 10.000 células CHO que expresan CD40L de conejo γ- irradiadas (barras a la izquierda) e IL-2 e IL-21 de diferentes orígenes y combinaciones de las mismas. Se muestra la titulación de anticuerpos al cabo de 7 días en el sobrenadante de cultivo (media).
- Figura 12 Resultado del ensayo de viabilidad CTG para el co-cultivo de la Figura 11.
- Figura 13 Imágenes de microscopía del co-cultivo de linfocitos B y células nutrientes del Ejemplo 14 a baja densidad de linfocitos B (500 Linfocitos B).
- Figura 14 Se co-cultivaron 2.500 Linfocitos B IgG⁺ de conejo clasificados por pocillo con 10.000 células CHO-K1 γ-irradiadas (barras a la derecha) o 10.000 células CHO que expresan CD40L de conejo γ-irradiadas (barras de la izquierda) e IL-2 e IL-21 de diferentes orígenes o combinaciones de las mismas. Se muestra la titulación de anticuerpo tras 7 días en el sobrenadante de cultivo (media).

35 Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 01 secuencia de aminoácidos de CD40L de conejo.
 SEQ ID NO: 02 secuencia de aminoácidos de CD40L humano.
 SEQ ID NO: 03 secuencia de aminoácidos de CD40L de ratón.

40 Ejemplos

Métodos y materiales

45 Técnicas de ADN recombinante

Se emplearon los métodos normales para manipular el ADN tal como se describe Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Se utilizaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 Determinación de secuencia de ADN

Se determinaron las secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra realizada en SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

55 Análisis de ADN y secuencia de proteínas y gestión de datos de la secuencia

Se utilizó el paquete de software del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) variante 10.2 y Vector NTI Advance suite de Infomax variante 8;0 para la creación, localización, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

60 Síntesis de gen

Se prepararon los segmentos de gen que codifican ADNc del CD40L de conejo deseados con Genearth GmbH (Regensburg, Alemania). Los segmentos de gen están flanqueados por sitios de segmentación de endonucleasa de restricción singular para facilitar la expresión de clonación de constructo, tal como se describe más adelante. Se

ES 2 617 488 T3

confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN.

Citocinas

- 5 Mezcla Zubler: 2 ng/ml IL-1 β de ratón, 50 ng/ml IL-2 de ratón, 10 ng/ml IL-10 de ratón y 2 ng/ml TNF- α de ratón (concentración final).

Se sometieron a ensayo las citocinas para determinar el cóctel de citocinas (dado como concentración final si no se señala lo contrario):

10

Citocina	Concentración final	Proveedor	No. Cat.
huIL-2	50 U/ml	Roche Dia. GmbH	11147528001
huIL-21	25 ng/ml	eBioscience	14-8219
muIL-21	100 ng/ml	&Dsystems	R 594-ML
huIL-6	300 U/ml	Roche Dia. GmbH	11138600001
huIL-10	25 ng/ml	BD	554611
huIL-1 β	12,5 ng/ml	R&D systems	201-LB
huIL-33	100 ng/ml	Peptotech	200-33
TNF α	25 ng/ml	R&D systems	210-TA

Medio CHO rbCD40L

500 ml HyQSFM4CHO	# SH30549	Perbio
50 ml FCS	# A15-512	PAA
1 ml Pen/Estrep	# 11074440001	Roche Dia. GmbH
5 ml Higomicina	# 10843555-001	Roche Dia. GmbH

- 15 Medio de linfocitos B de conejo

500 ml RPMI 1640	#P04-17500	PAN Biotech
50 ml FCS	#A15-512	PAA
5 ml L-Gln	#25030-024	Invitrogen
5 ml piruvato de potasio	#P04-43100	PAN Biotech
5 ml HEPES	#15630-056	Invitrogen
500 μ l β -Mercaptoetanol	# 31350010	Invitrogen
1 ml Pen/Estrep	#11074440001	Roche Dia. GmbH

Aditivos para el medio de linfocitos B de conejo

SAC	#507858	Calbiochem
IL-21	#14-8219	eBioscience
IL-2	#1114752800	Roche

20

Fenotipificación / clasificación de anticuerpos

Anticuerpo Fc IgG anti-conejo	AbDSerotec	STAR121F
Anticuerpo CD138 anti-conejo de rata	Roche GlycArt AG	
mAb CD40 anti-humano (clon Mab89)	Beckman Coulter	IM1374
Anticuerpo anti CD40L anti humano/murino (reacción cruzada conejo) :		
Anticuerpo anti-CD40L:		
Anticuerpo anti-muCD40L	R&D systems	AF1163
Anticuerpo anti-huCD40L	R&D systems	AF617 R
Anticuerpo Alexa 488 IgG anti-cabra de burro	Molecular Probes	A11055

Miscelánea

25

Microesferas acopadas a anticuerpo anti-FITC	Miltenyi Biotec	#130-048-701
kit aislamiento negativo linfocitos B humanos	Invitrogen	#113,13D
Nucleofector Kit T	Lonza	VCA-1002
CBA para total IgG	BD Biosciences	#558679

Animales

Se emplearon como fuente de sangre Conejos blancos neozelandeses de tipo silvestre. Fueron alojados y mantenidos con arreglo a las directrices del Comité institucional para cuidado y uso de animales y la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (Alemania, Europa).

Recubrimiento de placas

Se incubaron placas de 6 pocillos recubiertas con estreptavidina estéril (calidad de cultivo celular) con antígenos biotinilados en una concentración de 0,5-1 mg/ml en PBS a temperatura ambiente durante una hora. Se recubrieron las placas de 6 pocillos del cultivo celular estéril con 2 mg/ml de antígeno de proteína no biotinilado en tampón carbonato (bicarbonato sódico 0,1 M, 34 mM hidrógeno carbonato disódico pH 9,55) durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes de su uso.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de conejo

Se diluyó EDTA que contenía sangre completa dos veces con 1 x PBS antes de la centrifugación de densidad sobre linfocito de mamífero (Cedarlane Laboratories) o Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, cat. n.º 17-1440-03), que se llevó a cabo para aislar PBMC de conejo. Se lavaron las PBMC dos veces antes del teñido con anticuerpos.

Medio EL4-B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con 10 % FCS (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.), 2 mM Glutamina, solución al 1 % penicilina/estreptomina (PAA, Pasching, Austria), 2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y 0,05 mM β -mercaptoetanol (Gibco, Paisley, Escocia).

Empobrecimiento de macrófagos/monocitos

Se emplearon placas de 6 pocillos estériles (calidad de cultivo celular) para empobrecer macrófagos y monocitos por adhesión inespecífica. Se cargó cada pocillo con un máximo de 4 ml de medio y hasta 6×10^6 células mononucleares de sangre periférica de conejo inmunizado y dio cabida a la unión durante una hora a 37 °C en la incubadora. Se utilizó un 50% de las células en el sobrenadante para la etapa de selección; se mantuvo el 50% de células restante sobre el hielo hasta el teñido inmuno fluorescente.

Enriquecimiento de linfocitos B sobre el antígeno de proteína

Se sembraron placas de cultivo de tejido de seis pocillos recubiertos con el antígeno de proteína con hasta 6×10^6 células por cada 4 ml de medio y se dio cabida a la unión durante una hora a 37 °C en la incubadora. Después de la etapa de enriquecimiento sobre el antígeno de proteína, se separaron las células no adherentes mediante un cuidadoso lavado de los pocillos 1-2 veces con 1 x PBS. Se desprendió el resto de las células pegajosas con tripsina durante 10 min a 37 °C en la incubadora y después se lavaron dos veces en medio. Se guardaron las células sobre hielo hasta el teñido inmunofluorescente.

Teñido inmunofluorescente y citometría de flujo (análisis de clasificación)

La FITC IgG Anti-conejo utilizada para la clasificación de célula simple fue de AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Alemania).

Para el teñido superficial, se incubaron las células con el anticuerpo FITC IgG anti-conejo diluido óptimamente en PBS durante 30 min con rodamiento a 4 °C en la oscuridad. Tras la centrifugación, se separaron los sobrenadantes por aspiración. Se sometieron las PBMC a dos ciclos de centrifugación y lavado con PBS enfriado con hielo. Finalmente, se resuspendieron las PBMC en PBS enfriado con hielo y se sometieron inmediatamente a análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 μ g/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) antes de los análisis FACS para discriminar entre células vivas y muertas. En otros experimentos, las células teñidas se depositaron individuales por FACS.

Se utilizaron un Becton Dickinson FACSAria equipado con ordenador y el software FACSDiva (BD Biosciences, EE.UU.) para recoger y analizar los datos.

Ensayos de proliferación

a) Ensayo de viabilidad Cell Titer Glo (CTG)

Se utiliza el ensayo de viabilidad CTG (Promega; n.º G7571) con arreglo a las instrucciones del fabricante.

b) Ensayo de H³ timidina

Tras 6 días de incubación, se añadió H³ –timidina (0,5 µCi/pocillo) y se incubó durante 16 horas más. La incorporación de H³ –timidina durante la proliferación celular fue determinada con un contador de centelleo de microplacas.

c) Análisis microscópico

Para obtener imágenes de microscopio, se utilizó un microscopio de contraste de fases de Leica (Leica DM IL) en combinación con una cámara de alta resolución.

d) Análisis de activación de linfocitos B a través de marcado con CFSE.

Se lavaron los linfocitos B aislados con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Se resuspendieron hasta 1 x 10⁷ células en 1ml de PBS sin proteína y se incubaron con CFSE (n.º C34554, Invitrogen/Molecular Probes) durante 3 a 10 minutos a una concentración final de 2,5 mM a 37°C. Se detuvo la carga de CFSE por adición de un exceso de medio suplementado con FCS. Tras un extensivo lavado con medio que contenía FCS, se utilizaron los linfocitos B en los experimentos de co-cultivo. Se confirmó por análisis de citometría de flujo la proliferación de linfocitos B CD19⁺ gatillados como consecuencia de la dilución de CFSE (canal FL-1). Tras los puntos en el tiempo indicados.

Cultivo de linfocitos B

Se prepararon cultivos de linfocitos B según un método similar al que se describe en Zubler, *et al.* (véase p.ej. Eur. J. Immunol. 14 (1984) 357-363; J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183).

Brevemente, se cultivaron linfocitos B clasificados individuales en placas de 96 pocillos con 210 µl/pocillo de medio EL4 B5 con células Pansorbin (1:20000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocito de conejo al 5 % y células de timoma murino EL4-B5 gamma-irradiadas (2x10⁴/pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5 % en la incubadora. Se separaron los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B para la exploración y se cosecharon las células inmediatamente para la recuperación génica de región variable o se congelaron a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

Se cultivaron linfocitos B humanos en correspondencia. Se utilizaron células nutrientes que expresan CD40L humano (Células BHK) para los co-cultivos y las mezclas nutrientes indicadas.

Ejemplo 1

Generación de plásmidos de expresión para CD40L de longitud completa de conejo

Se tomó la secuencia de aminoácidos para el gen de CD40L de conejo de GenBank, Número de acceso XP_002720374 (SEQ ID NO: 01).

Secuencia de ADNc CD40L de conejo XP_002720374 - SEQ ID NO: 01

```

1  MIETYSQPTP RSVATGPSVS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRRL
51  DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNKGEGSLS LLNCKEIRSQ FEGFVKDIML
101 NKEEPKKEIN FEMQKGDQDP QIAAHLISEA SSKSSSVLQW AKKGYYTMSN
151 TLVTLENGKQ LKVKRQGFYY IYAQVTFCSN QEPSSQAPFI ASLCLKSSGG
201 SERILLRAAN ARSSSKTCEQ QSIHLGGVFE LQADASVFN VTDASQVNHG
251 TGFTSFGLLK L
    
```

Se realizó la retro-traducción de la secuencia de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de codificación (ADN).

Plásmido número 7111

Se clonó el segmento de gen que codifica el ADNc del CD40L de conejo sintetizado en un vector de expresión. En dicho vector de expresión, se controla la expresión por un intrón A acortado -suprimido inmediatamente antes el potenciador y el promotor desde citomegalovirus humano (HCMV), que incluye una región sin traducir-5' (UTR) de inmunoglobulina de cadena pesada humana, en la que se incluyen el intrón A con sitios de corte y empalme donador y aceptor, el gen CD40L de conejo de longitud completa con su secuencia de ancla de señal y la señal de poliadenilación fuerte de hormona de crecimiento bovino. El plásmido de expresión contiene también un origen de replicación y un gen B-lactamasa del vector pUC18 para la amplificación de plásmido en Escherichia coli.

Plásmido número 7112

Se construyó el plásmido número 7112 de la misma manera que el plásmido número 7111, pero contiene un gen de resistencia a la higromicina adicional para la generación /selección de líneas de células de mamífero establemente transfectadas.

Ejemplo 2

Generación de células CHO-K1 que expresan CD40L de conejo

De acuerdo con las instrucciones del fabricante se transfectaron células CHO-K1 (ATCC CCL-61) con un plásmido de codificación de CD40L (n.º 7112) (p.ej. utilizando un método de lipofección o el kit T Nucleofector (Lonza anteriormente Amaxa, VCA-1002) con el programa Nucleofector U-17). Después de cultivar las células de transfección en placas de 6 pocillos durante 24 horas, se añadieron hasta 0,5 mg/ml de higromicina para establecer la presión de selección. Dos semanas después de la transfección, se suplementó el medio con FCS 10 % (v/v). Después de una fase de expansión y selección de cinco semanas, se analizaron las células transfectadas en un FACS Aria utilizando anticuerpo primario CD40L anti-murino de cabra policlonal de reacción cruzada (R&D Systems; AF1163) y anticuerpo secundario IgG anti-cabra (teñido con Alexa488-; Molecular Probes; n.º A11055). Se utilizaron las células con la intensidad de fluorescencia media más alta (5 % la más alta) para una clasificación de célula única en placas de 96 pocillos de fondo en U. Transcurridas dos semanas más de expansión, se analizaron los clones por FACS para determinar la expresión de CD40L de conejo.

Igualmente, se obtuvieron células BHK que expresan CD40L humano.

Ejemplo 3

Irradiación de células nutrientes para-co-cultivo

Se cultivaron clones CHO que expresan establemente CD40L de conejo bajo una presión de selección (0,5 mg/ml higromicina) en medio CHO rbCD40L y se almacenaron en nitrógeno hasta uso posterior.

Dos pasos antes de utilizar las células como estimuladores para los linfocitos B de conejo clasificados, se separó la higromicina del medio y un día antes del co-cultivo, se convirtió el medio a medio de linfocito B de conejo. Se cosecharon las células y se ajustaron a una concentración de células de 1×10^6 /ml antes de la γ -irradiación a 50 Gy. Tras ello, se colocaron en placa 1×10^4 en 100 ml por pocillo en una placa de 96 pocillos con el fondo en U, se centrifugaron durante 1 minuto a 500 x g y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Ejemplo 4

Método de aislamiento de células secretoras de anticuerpo primarias (CSA) derivadas de sangre periférica de conejo

Para el aislamiento de los linfocitos B de conejo, se utilizó sangre entera de conejos blancos neozelandeses no inmunizados.

En algunos enfoques, en una primera etapa, se aisló la población de linfocitos por centrifugación de densidad con linfocitos B (Biozol; n.º CL5120) o Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, cat. n.º 17-1440-03). En una segunda etapa, se incubaron los linfocitos de conejo con un anticuerpo específico IgG anti-conejo marcado con FITC (concentración final = 10 mg/ml; STAR121F; Serotec). A continuación, se purificaron células FITC+ (células rblgG+) con microperlas anti-FITC (n.º 130-048-701; Miltenyi Biotec) (depósito de agrupación).

En otros enfoques ("depósito de célula única"), se seleccionaron FITC+ células por tecnología FACS (véase Materiales y Métodos).

Ejemplo 5

Establecimiento de un Sistema de cultivo

En experimentos preliminares, se co-cultivaron principalmente células estimuladoras y linfocitos B de conejo en una relación de 2:1.

Se clasificaron linfocitos B individuales de conejo sobre placas preparadas con las células estimuladoras utilizando FACS Aria, tal como se ha descrito en el ejemplo 4. Para el co-cultivo de linfocito B único, se depositó un linfocito B de conejo en una monocapa de 10.000 células nutrientes irradiadas. Cuando estuvo indicado, se añadió una mezcla nutriente (p.ej. los suplementos normales fueron 25 ng/ml IL-21, 50 U/ml IL-2 y 1:10.000 SAC) en 100 ml de medio de linfocitos B y se desarrollaron los co-cultivos durante 6 días a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Ejemplo 6

Producción de anticuerpos visualizada por ELISA específico de IgG

5 Después del co-cultivo, se transfirieron 150 µl del sobrenadante de cultivo para la posterior determinación de IgG de conejo. Se almacenaron los linfocitos B expandidos de conejo en nitrógeno líquido en un formato de 96 pocillos añadiendo FCS y DMSO.

10 Opcionalmente, se prolonga el periodo de incubación hasta 11-14 días. Por lo tanto, se añadieron 150 µl de medio de linfocitos B de conejo recién preparado con mezcla nutriente y SAC y se volvió a evaluar el sobrenadante para determinar la concentración de IgG de conejo.

Ejemplo 7

15 Cultivo de IgG+ Linfocitos B de conejo

Se cultivaron linfocitos B de conejo IgG⁺ clasificados individuales en combinación con la línea celular de timoma murino EL4-B5 y sobrenadante de timocito de conejo (SNT) y SAC o en presencia de una línea celular CHO que expresa CD40L de conejo (10.000 células/pocillo; +/- SAC adicional) durante una semana. Se reemplazó el SNT por citocinas recombinantes IL-2 e IL-21.

20 Al cabo de 6 días, se llevó a cabo un ELISA específico de IgG de conejo y se determinó el porcentaje de células de conejo IgG⁺ (del total de células) (determinación de la productividad rIgG).

25 Resultados:

El porcentaje de células IgG⁺ de conejo fue superior cuando se utilizó el sistema de co-cultivo que comprendió células CHO que expresan CD40L de conejo y una mezcla de IL-2 e IL-21 (7,1 % frente a 6,7 % (con células EL4-B5)). La diferencia aumentó cuando se añadió solo SAC a las células CHO que expresan CD40L de conejo (17,9 % frente a 6,7 %). Se obtuvieron resultados similares al utilizar linfocitos B de conejo de diferentes campañas de inmunización contra diferentes antígenos, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tablas: co-cultivos de linfocitos B que comprenden diferentes mezclas nutrientes. Se muestra el porcentaje de pocillos IgG⁺

35

[%] pocillos IgG ⁺	células nutrientes Mezcla nutriente	pocillos IgG ⁺		
		Células EL4-B5 SNT SAC	Células rbCD40L IL-2/21 SAC	Células rbCD40L IL-2/21
Campaña	1	36,1	16,7	6,0
	2	6,7	17,9	7,1

[%] pocillos IgG ⁺	células nutrientes Mezcla nutriente	Células EL4-B5		Células rbCD40L
		SNT	SAC	IL-2/21 SAC
Campaña	3	13,1		16,2
	4	5,9		53,8
	5	0		6,8
	6	5,6		5,8

[%] pocillos IgG ⁺	células nutrientes Mezcla nutriente	Células EL4-B5 SNT SAC	Células rbCD40L IL-2/21 SAC	mezcla de células
				EL4-B5 y células rbCD40L IL-2/21 SAC
Campaña	7	5,9	10,7	8,9

40

En el co-cultivo de linfocitos B clasificados doble positivos IgG+CD138+ el sistema rbCD40L con la adición de citocinas y SAC no tuvo como resultado clones de linfocitos B productores de IgG. El co-cultivo con las células EL4-B5 (incl. SNT y SAC) tuvo como resultado clones de linfocitos B y producción de IgG, tal como se muestra en la siguiente Tabla (22,2 % frente a ninguna proliferación significativa observable frente a 6,0 %).

Tabla: Co-cultivo de linfocitos B clasificados IgG⁺CD138⁺

[%] pocillos IgG ⁺	Células nutrientes Mezcla nutriente	Células EL4-B5 SNT SAC	Células rbCD40L IL-2/21 SAC	Células rbCD40L IL-2/21
campaña	8	22,2	(no detectable/BDL*)	6.0
(*no se observa una proliferación significativa)				

Ejemplo 8

5 Sistema de cultivo de linfocito B de conejo

Se co-cultivaron 2.500 linfocitos B IgG⁺ de conejo /pocillo con células CHO que expresan CD40L de conejo irradiadas o células EL4-B5 (5.000 cada uno) sin adición de SNT. Además del co-cultivo sin ningún suplemento, se sometió a ensayo el impacto de la adición de IL-2 humana recombinante frente a la mezcla Zubler. Al cabo de 7 días de co-cultivo, se determinó la proliferación de los Linfocitos B aplicando el ensayo CTG tal como se ha descrito anteriormente. Los co-cultivos que comprendían células rbCD40L tuvieron como resultado proliferación de linfocitos B (véase la siguiente Tabla y la Figura 1). Se puede observar que la suplementación de IL-2 tuvo como resultado una mayor proliferación en comparación con la adición de la llamada mezcla Zubler.

10

15 Tabla: Proliferación de linfocitos B de conejo en presencia de diferentes componentes nutrientes (medio, SAC, EL4-B5 y-irradiadas o células que expresan rbCD40L) y citocinas adicionales.

Linfocitos B (2.500 por pocillo) en presencia de	sin citocinas [ULR]	Mezcla Zubler [ULR]	huIL-2 [ULR]
medio	807	1697	1225
SAC	954	1565	1805
Células EL4-B5 (5.000)	1432	3901	2098
Células EL4-B5 (5.000) y SAC	8318	8413	4848
Células rbCD40L (5,000)	278750	577021	909641
Células rbCD40L (5,000) y SAC	367092	792172	1083221

Se cultivaron 500 linfocitos B de conejo por pocillo en una relación de 1:10 con las células nutrientes y los estímulos indicados (véase tabla a continuación). Al cabo de 7 días de cultivo, se observó que había mejorado el crecimiento de los co-cultivos de linfocitos B de conejo con células CHO que expresan rbCD40L en comparación con las células sin expresión de CD40L (determinado por ensayo CTG).

20

Tabla: Proliferación de linfocitos B [ensayos ULR/CTG]. Se co-cultivaron 500 linfocitos B/pocillo durante 7 días con los sistemas celulares indicados y citocinas recombinantes/mezclas adicionales

Linfocitos B (500 por pocillo en presencia de	muIL-21 huIL-2 [ULR]	huIL-21 huIL-2 [ULR]	huIL-21 [ULR]	muIL-21 [ULR]	huIL-2 [ULR]
Solo Linfocitos B	874	1170	651	795	552
SAC	2389	2962	1314	1642	1261
Células CHO tipo silvestre	41901	38774	39538	37841	34401
Células CHO tipo silvestre y SAC	41130	48654	34626	33234	35804
Células rbCD40L	961594	900960	245470	326428	87819
Células rbCD40L y SAC	777151	900366	105349	158961	112764

25

Se detectó un efecto proliferativo en presencia de células nutrientes que expresan rbCD40L. En principio, la adición de IL-2 e IL-21 recombinante aumentó el crecimiento celular. En estas condiciones, la adición de SAC no presentó ninguna mejora. En cambio, en otras condiciones, la adición de SAC mejoró ligeramente la proliferación. En contraposición, ni IL-2, IL-21 ni la combinación de ellos tuvo como resultado una mejora en el co-cultivo que comprendía EL4-B5. En la Figura 2 se presentan a modo de ejemplo, pocillos en los que se obtuvieron la proliferación y la densidad celular más altas en el co-cultivo con células rbCD40L (indicado citocinas/mezclas). En el mismo experimento, los mismos sistemas de co-cultivo también tuvieron como resultado una mejor producción de IgG de conejo al cabo de 7 días. Tanto las células que expresan rbCD40L como la adición de IL-21 o la combinación de IL-2/21 tuvo efecto (véase la Tabla a continuación).

30

35

Tabla: Producción de IgG mediante 500 linfocitos B/pocillo al cabo de 7 días [ng/ml]: IL-2 e IL-21

Linfocitos B (500 por pocillo) Adición de linfocitos B en presencia de	mulL-21 hulL-2 [ng/ml]	hulL-21 hulL-2 [ng/ml]	hulL-21 [ng/ml]	mulL-21 [ng/ml]	hulL-2 [ng/ml]
Solo Linfocitos B	109	111	86	84	84
SAC	111	111	84	84	84
Células CHO tipo silvestre	115	113	85	87	85
Células CHO tipo silvestre y SAC	114	109	88	87	83
Células rbCD40L	4042	9000	2727	2941	89
Células rbCD40L y SAC	4244	2845	425	194	80

5 En dos experimentos por separado, se co-cultivaron linfocitos B de conejo individuales y agrupados con células EL4-B5 o células que expresan rbCD40L en presencia de SNT y SAC con IL-2/IL-6/IL-21 en varias combinaciones. En la Tabla que se presenta a continuación, se muestran los resultados (se hizo el recuento del número de pocillos con producción de IgG de conejo detectable). La combinación de células nutrientes que expresan rbCD40L y SNT y SAC no tuvo como resultado una producción de IgG comparable al sistema EL4-B5. Por otra parte, en el co-cultivo de linfocitos B de conejo con células que expresan rbCD40L y una combinación de las citocinas indicadas, como (hu) IL-2 e IL-21, se produjo significativamente más IgG (se muestra como el porcentaje o número de pocillos IgG⁺). No se detectó ningún pocillo IgG⁺ con la adición de SAC en solitario y células estimuladoras rbCD40L. SAC aumentó la respuesta de IgG de la IL-2/21 suplementada con el sistema nutriente rbCD40L (véase las Tablas a continuación).

Tabla: Producción de IgG de conejo de linfocitos B clasificados individuales (porcentaje de pocillos rblgG⁺ (columnas de la izquierda) o números absolutos de pocillos lgG⁺ (columnas de la derecha)).

[%] pocillos IgG ⁺	Células EL4-B5	Células rbCD40L	[número] pocillos lgG ⁺	Células EL4-B5	rbCD40L
SNT y SAC	54	0	SNT y SAC	39	0
hulL-2 y hulL-21	0	12	hulL-2 y hulL-21	0	8
hulL-2 y hulL-21 y SAC	4	17	hulL-2 y hulL-21 y SAC	3	12
hulL-2 y mulL-21	1	15	hulL-2 y mulL-21	1	11
hulL-2 y hulL-6 y hulL-21	11	26	hulL-2 y hulL-6 y hulL-21	8	19
hulL-2 y hulL-10 y hulL-21	4	26	hulL-2 y hulL-10 y hulL-21	3	19

Tabla: Producción de IgG de conejo de agrupaciones de linfocitos B depositados (números o porcentaje de pocillos lgG⁺).

	[número] células EL4-B5	células rbCD40L [número (%)]
SNT y SAC	Proliferación no detectable	0 (0%)
hulL-21 y hulL-2	Proliferación no detectable	6 (8,3%)
hulL-21 y hulL-2 y SAC	Proliferación no detectable	17 (23,6%)
mulL-21 y hulL-2	Proliferación no detectable	1 (1,4%)
hulL-21 y hulL-2 y hulL-6	Proliferación no detectable	0(0%)
hulL-21 y hulL-2 y hulL-10	Proliferación no detectable	0(0%)

Ejemplo 9

20 Sistema para generar anticuerpos de inhibición de linfocitos T

Después de la inmunización con un antígeno específico de linfocito T, se genera una agrupación de anticuerpos que no solamente se une al antígeno dado, sino que también puede presentar un posible efecto agonista. En caso de que el anticuerpo obtenido interfiera negativamente con la biología del linfocito T e interfiera asimismo con el sistema nutriente en caso de que el sistema de cultivo se base en un linfocito T (como la línea celular de timoma EL4-B5)

30 Se co-cultivan linfocitos B clasificados individuales, p.ej. de conejo o humanos, o bien con células nutrientes EL4-B5 o bien con células que expresan CD40L (véase, p.ej. Ejemplo 5). Los linfocitos B clasificados individuales se derivan pues de animales inmunizados con antígeno de linfocito T.

Se co-cultivan los linfocitos B clasificados individuales con la mezcla nutriente indicada. Al cabo de aproximadamente 7 días de cultivo, se determina el número de clones de linfocito B y se evalúa el sobrenadante de cultivo para determinar el contenido de IgG (tal como se describe en Materiales y Métodos y en el Ejemplo 6).

- 5 El co-cultivo se puede realizar con linfocitos B (clasificados individuales o agrupados) derivados de un animal de tipo silvestre o transgénico tras la inmunización con antígenos, p.ej., conocidos por sus propiedades de supresión de linfocitos T.

Ejemplo 10

10 Generación de un sistema de cultivo de linfocitos B secuencial

15 Se co-cultivan linfocitos B clasificados individuales derivados de un mamífero inmunizado con células que expresan CD40L irradiadas. En un primer cultivo, se añaden diferentes factores mitogénicos (p.ej. citocinas) (véase la lista a continuación) y se continúa el co-cultivo en presencia de los factores mitogénicos durante 1 a 14 días. Después de la primera fase de cultivo, se retira el factor del medio de cultivo (o bien cambiando el medio de cultivo por un medio sin factor mitogénico y/o lavando las células o bien por diálisis o centrifugación / sedimentación) y se continúa el cultivo en presencia de un estimulante de producción de anticuerpo (ver la lista a continuación). Se determina la concentración de IgG en el sobrenadante de cultivo en la segunda fase de cultivo al cabo de 3 o 5 o 7 o 21 días de co-cultivo.

20 El estimulante mitogénico se puede seleccionar de la lista que comprende CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-14, Interleucina-21, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ). La activación de linfocito B también podría inducirse a través de anticuerpos anti-IgG de unión cruzada, anticuerpos anti-CD20 de unión cruzada, y/o anti-CD27 de unión cruzada.

35 El estimulante de producción de anticuerpo se puede seleccionar de la lista que comprende CD40- y compuestos que interactúan con CD40L, ICOS- y compuestos que interactúan con ICOS-L, APRIL, BAFF, CR2, CXCL9, CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CXCL16, Flt-3L, Interleucina-1 (α/β), Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-14, Interleucina-21, SAP (proteína asociada a molécula de activación de señalización de linfocitos [SLAM]), partículas de cepa Cowan 1 de *Staphylococcus* A (SAC; eliminada con calor, fijada con formalina), ligandos TLR como LPS, distintos CpG ODNs o Resiquimod (R-848), TSLP, factor de necrosis de tumor (TNF) alfa, Interferones tipo I (p.ej. IFN α/β), e Interferón tipo II (p.ej. IFN γ). La activación de linfocito B también podría inducirse a través de anticuerpos anti-IgG de unión cruzada, anticuerpo anti-CD20 de unión cruzada, y/o anti-CD27 de unión cruzada.

Ejemplo 11

45 Sistema de co-cultivo para generar anticuerpos humanos

Se determinó el efecto de diferentes citocinas en la promoción del crecimiento de linfocitos B humanos en presencia de células BHK que expresan CD40L humano, tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

50 Se sembraron PBMC humanas aisladas con Ficoll (2×10^5) en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 8 días en presencia de los estímulos indicados. Opcionalmente, se añadieron anticuerpos CD3/CD28 para inducir una estimulación de linfocitos T policlonales. Tal como se puede apreciar por la siguiente Tabla, IL-21 humana recombinante indujo la mayor producción de IgG humana (independiente de la activación de linfocitos T adicionales).

Tabla: Producción de IgG humana al cabo de 8 días.

PBMC humanas más ...	w/o [$\mu\text{g/ml}$]	CD3/CD28 [$\mu\text{g/ml}$]
Medium	0,22	0,09
LPS	0,00	0,00
FNT□	0,11	0,00
huIL-6	0,16	0,02
huIL-21	4,31	0,00

55 Se co-cultivaron linfocitos B IgG⁺ humanos periféricos aislados (750 por pocillo y 2.500 por pocillo, respectivamente con células BHK que expresan CD40L humano γ -irradiado en presencia de diferentes estímulos (véase la tabla a continuación y la Figura 3).

Tabla. [%] Proliferación relativa de linfocitos B periféricos humanos al cabo de 8 días

Linfocitos B humanos y células BHK que expresan CD40L en presencia de...	750 linfocitos B de memoria IgG ⁺ / pocillo	Linfocitos B humanos y células BHK que expresan huCD40L en presencia de...	2.500 linfocitos B IgG ⁺ / pocillo
Medio	100	Medio	100
CpG e IL-6	95	CpG e IL-6	113
IL-4	101	IL-4	115
IL-2	89	IL-2	101
FNTα e IL-6	71	FNTα e IL-6	101
IL-21	136	IL-21	145
IL-33	91	IL-33	105
IL-2 e IL-6	101	IL-2 e IL-6	104
IL-2 e IL-21	130	IL-2 e IL-21	150
IL-6 e IL-21	129	IL-6 e IL-21	127
IL-2 e IL-6 e IL-21	141	IL-2 e IL-6 e IL-21	152
SAC e IL-2 e IL-6	136	SAC e IL-2 e IL-6	131
SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	132	SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	101

Se puede observar que los linfocitos B de memoria IgG⁺ aislados (aislados con MACS kit n.º 130-094-350), así como los linfocitos B IgG⁺ (aislados directamente con microperlas anti-IgG (MACS kit n.º 130-047-501) respondieron de manera similar a estímulos diferentes. La adición de IL-21 en solitario (o en combinación) tuvo como resultado una mejor respuesta de proliferación al cabo de 8 días de co-cultivo. La co-estimulación con IL-2, IL-6 o una combinación de ellos no potenció el efecto, como tampoco lo hizo la adición de SAC.

Se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar la producción de IgG. En la Tabla que se muestra a continuación, se puede observar que la adición de IL-21 y sus combinaciones tuvo como resultado una mejor producción de IgG en un co-cultivo con células BHK que expresan huCD40L.

Tablas: Producción de IgG humana al cabo de 8 días

Linfocitos B de memoria IgG ⁺ (750/pocillo) con células BHK que expresan huCD40L y	IgG humana al cabo de 8 días [ng/ml]
FNTα e IL-6	100
IL-6	50
IL-21	3010
IL-2 e IL-21	530
IL-6 e IL-21	2480
IL-2 e IL-6 e IL-21	2390
SAC e IL-2 e IL-21	10
SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	110

Total de linfocitos B IgG ⁺ (2.500/pocillo) con células BHK que expresan huCD40L y	IgG humana al cabo de 8 días [ng/ml]
FNTα e IL-6	0
IL-6	60
IL-21	3845
IL-2 e IL-21	750
IL-6 e IL-21	2885
IL-2 e IL-6 e IL-21	2955
SAC e IL-2 e IL-21	285
SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	135

Asimismo, se evaluó la proliferación de linfocitos B humanos aislados intactos. Se separaron los linfocitos B de PBMC utilizando un kit Dynal Kit 113.13D (Invitrogen), se hizo el recuento y co-cultivaron 90.000 linfocitos B marcados con CFSE por pocillo con células BHK que expresan CD40L humano γ-irradiadas (CFSE-negativas). En la Tabla y en la Figura 4 se muestran los resultados.

Tabla: Proliferación de linfocitos B (número absoluto de células contadas por análisis FACS de células CD19⁺).

Linfocitos B y células BHK que expresan huCD40L	Proliferación de linfocitos B [número de células]
medio	132
anticuerpo anti-huCD40	1995
LPS	240
CpG	263
FNTα	241

Linfocitos B y células BHK que expresan huCD40L	Proliferación de linfocitos B [número de células]
SAC	336
IL-1b	84
IL-2	244
IL-4	600
IL-6	256
IL-10	422
IL-21	1542
IL-2 e IL-6	242
IL-2 e IL-6* (IL-6 añadida al cabo de 48 horas)	283
IL-2 e IL-21	3659
IL-2 e IL-6 e IL-21	4247
SAC e IL-1b e IL-6	281
SAC e IL-2 e IL-6	641
SAC e IL-2 e IL-6* (IL-6 añadida al cabo de 48 horas)	985
SAC e IL-2 e IL-21	3588
SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	3357

El número absoluto de células aumenta mediante la adición de IL-21 en solitario o IL-2/IL-21 o IL-21/IL-6/IL-21.

5 Los gráficos de puntos ilustrativos presentan la dilución de CFSE como el grado de proliferación analizado por FACS (véase Figura 5): la adición de IL-21 o en combinación con IL-2 e IL-2/-6 aumentó la proliferación de linfocitos B (se muestran las células separadas CD19⁺).

10 Se utilizaron linfocitos B humanos no tratados previamente e intactos, con empobrecimiento de linfocitos B activados, linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos, granulocitos, plaquetas, células plasmáticas y eritrocitos (Dynal kit, Invitrogen, n.º 113.13D) en co-cultivo con células BHK que expresan CD40L humano γ -irradiadas y diversos estímulos adicionales. En la Tabla que se muestra a continuación, se presenta la proliferación de 50.000 linfocitos B /pocillo depositados.

15 Tabla: Proliferación de linfocitos B no tratados previamente (50.000/pocillo) en co-cultivo con células BHK que expresan huCD40L irradiadas durante 7 días (número de linfocitos B proliferados por análisis FACS).

Linfocitos B y células BHK que expresan huCD40L y	Proliferación de linfocitos B [número de células]
Medio	0
anticuerpo anti-huCD40	62
LPS	1324
CpG	1587
FNT α	960
SAC	1147
IL-1b	2103
IL-2	2361
IL-4	8145
IL-6	2619
IL-10	4422
IL-21	16275
IL-1b e IL-6	989
IL-2 e IL-6	1500
IL-2 e IL-6* (IL-6 añadida al cabo de 48 horas)	2265
IL-2 e IL-21	19210
IL-2 e IL-6 e IL-21	19017
SAC e IL-1b e IL-6	927
SAC e IL-2 e IL-6	2509
SAC e IL-2 e IL-6* (IL-6 añadido al cabo de 48 horas)	2732
SAC e IL-2 e IL-21	19057
SAC e IL-2 e IL-6 e IL-21	16607

La adición de IL-21 (en solitario o en combinación con IL-2 y/o IL-6) tuvo como resultado un mejor crecimiento de linfocitos B.

20 Ejemplo 12

Sistema de cultivo de linfocitos B utilizando SAC

Se cultivaron Linfocitos B humanos aislados (5×10^4 células/pocillo aislados de PBMC humanas sin tratar previamente empleando un kit de aislamiento de linfocitos B por selección negativa (n.º 113.13D, Invitrogen)) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron durante 6 días en presencia de los suplementos indicados antes de determinar la proliferación (ensayo CTG) o la producción de IgG humana (ELISA). En la Tabla a continuación se muestran los resultados.

5

Tabla

Linfocitos B humanos y	Proliferación [ULR]	total hulgG en sobrenadante [ng/ml]
-	6453	0
IL-2	22217	3,9
SAC	60817	55,1
SAC e IL-6	69512	46,6
SAC e IL-2 e IL-6	200882	273,9
SAC e IL-2	295067	546,5

10

Se puede observar que SAC en combinación con IL-2 y en menor grado la combinación de IL-2 e IL-6 tuvo como resultado una proliferación de linfocitos B y producción de IgG mejores. En la Figura 6 se muestran linfocitos B en grupo al cabo de 3 días de incubación a modo de ejemplo.

Con el empleo de una agrupación de linfocitos B de conejo periféricos purificados, la adición de SAC tuvo como resultado una mayor proliferación de linfocitos B (véase las tablas a continuación).

15

Tabla: Proliferación de linfocitos B de conejo en presencia de diferentes componentes nutrientes (medio, SAC, EL4-B5 o células que expresan rbCD40L y-irradiadas) y citocinas adicionales

Linfocitos B (2.500 por pocillo) en presencia de	sin citocinas [ULR]	Mezcla Zubler [ULR]	huIL-2 [ULR]
medio	807	1697	1225
SAC	954	1565	1805
Células EL4-B5 (5.000)	1432	3901	2098
Células EL4-B5 (5.000) y SAC	8318	8413	4848
Células rbCD40L (5.000)	278750	577021	909641
Células rbCD40L (5.000) y SAC	367092	792172	1083221

20

Tabla: Proliferación de linfocitos B [ensayos ULR/CTG], se co-cultivaron 500 linfocitos B/pocillo durante 7 días con los sistemas celulares indicados y citocinas recombinantes/mezclas adicionales

Linfocitos B (500 por pocillo) en presencia de	muIL-21 huIL-2 [ULR]	huIL-21 huIL-2 [ULR]	huIL-21 [ULR]	muIL-21 [ULR]	huIL-2 [ULR]
solamente Linfocitos B	874	1170	651	795	552
SAC	2389	2962	1314	1642	1261
Células CHO tipo silvestre	41901	38774	39538	37841	34401
Células CHO tipo silvestre y SAC	41130	48654	34626	33234	35804
Células rbCD40L	961594	900960	245470	326428	87819
Células rbCD40L y SAC	777151	900366	105349	158961	112764

La adición de SAC también tuvo como resultado un aumento de la producción de IgG de los linfocitos cultivados (número de pocillos IgG positivos y/o secreción de IgG).

25

Ejemplo 13

Co-cultivo de linfocito B de conejo

30

Se co-cultivaron 500 linfocitos B IgG⁺ de conejo /pocillo con células CHO que expresan CD40L de conejo y-irradiadas o células CHO-K1 y-irradiadas (10.000 cada uno) sin adición de SNT. Además del co-cultivo sin ningún suplemento, se determinó el impacto de la adición de IL-2 recombinante humana, IL-2 recombinante murina, IL-21 recombinante humana, IL-21 recombinante murina y combinaciones de ellas. Al cabo de 7 días de co-cultivo, se determinó la titulación de anticuerpo en el sobrenadante de los linfocitos B utilizando ELISA, tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos que comprendieron células rbCD40L en presencia de IL-2 e IL-21 tuvieron como resultado la proliferación de linfocitos B y secreción de anticuerpos (véase las Figuras 7 y 8).

35

Ejemplo 14

Co-cultivo de linfocitos B de conejo

40

Se co-cultivaron 500 linfocitos B aislados de PBMC IgG⁺ de conejo congeladas y descongeladas por pocillo con células CHO que expresan CD40L de conejo γ -irradiadas o células CHO-K1 γ -irradiadas (10.000 cada uno) sin adición de SNT. Además del co-cultivo sin ningún suplemento, se determinó el impacto de la adición de IL-2 recombinante humano, IL-2 recombinante murino, IL-21 recombinante humano, IL-21 recombinante murino y combinaciones de ellos. Al cabo de 7 días de co-cultivo, se determinó la titulación de anticuerpos en el sobrenadante de los linfocitos B utilizando ELISA tal como se ha descrito anteriormente. Los co-cultivos que comprendieron células rbCD40L en presencia de IL-2 e IL-21 tuvieron como resultado la proliferación de linfocitos B y secreción de anticuerpos véase las Figuras 9 y 10).

10 Ejemplo 15

Sistema de cultivo de linfocitos B sintéticos de conejo

Densidad de linfocitos B baja:

15 Se co-cultivaron 500 linfocitos B IgG⁺ de conejo /pocillo (aisladas de conejo NZW) con células CHO que expresan CD40L de conejo γ -irradiadas o células CHO-K1 γ -irradiadas (10.000 cada uno) sin adición de SNT. Además del co-cultivo sin ningún suplemento, se determinó por ensayo el impacto de la adición de IL-2 recombinante humana, IL-2 recombinante murina, IL-21 recombinante humana, IL-21 recombinante murina y combinaciones de ellas. Al cabo de 20 7 días de co-cultivo, se determinó la titulación de anticuerpo en el sobrenadante de los linfocitos B utilizando ELISA, tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos que comprendieron células rbCD40L en presencia de IL-2 e IL-21 tuvieron como resultado la proliferación de linfocitos B y secreción de anticuerpos (véase las Figuras 11 y 12).

Densidad de linfocitos B alta:

25 Se co-cultivaron 2.500 linfocitos B IgG⁺ de conejo /pocillo (del mismo conejo NZW utilizado para el anterior experimento de baja densidad) con células CHO que expresan CD40L de conejo γ -irradiadas o células CHO-K1 γ -irradiadas (10.000 cada uno) sin adición de SNT. Además del co-cultivo sin ningún suplemento, se determinó por 30 ensayo el impacto de la adición de IL-2 recombinante humana, IL-2 recombinante murina, IL-21 recombinante humana, IL-21 recombinante murina y combinaciones de ellas. Al cabo de 7 días de co-cultivo, se determinó la titulación de anticuerpo en el sobrenadante de los linfocitos B utilizando ELISA, tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos que comprendieron células rbCD40L en presencia de IL-2 e IL-21 tuvieron como resultado la proliferación de linfocitos B y secreción de anticuerpos (véase las Figura 14).

35 Ejemplo 16

Análisis cinético del sistema de cultivo de linfocitos B sintéticos

40 Se enriquecen magnéticamente células IgG⁺ de conejo de PBMC de sangre completa de conejo NZW, tal como se describe en el Ejemplo 4. Se cultivaron 500 linfocitos B de conejo por pocillo en una relación de 1:20 con células CHO nutrientes CD40L⁺ γ -irradiadas de conejo o células nutrientes CHO-K1 γ -irradiadas de control (10.000 de cada una; la generación como se describe en los Ejemplos 1-3) en ausencia o presencia de IL-2, IL-21 o una combinación de IL-2 e IL-21 (del mismo origen o de origen diferente, p.ej. ratón y ser humano). Al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de cultivo (d1-d7) se evaluaron los co-cultivos de linfocitos B de conejo con células CHO que expresan CD40L de 45 conejo para determinar la producción de IgG de conejo en el sobrenadante, así como el crecimiento celular. Estos datos se comparan con las células co-cultivadas con células nutrientes sin expresión de CD40L y/o en ausencia de estímulos exógenos adicionales (las mismas interleucinas individuales o combinaciones de interleucinas). La cinética de crecimiento y proliferación se determinan por ensayo CTG y por análisis microscópico (véase lo anterior).

50 Las interleucinas se aplican en las siguientes concentraciones finales:

- IL-2 murino a 50 U/ml (Roche Diagnostics GmbH, cat n.º 11271164001)
- IL-2 humano a 50 U/ml (Roche Diagnostics GmbH, cat. n.º 11147528001)
- IL-21 humano en el intervalo de la misma concentración ED50 al triple que varía entre 10-100 ng/ml, dependiendo del lote de IL-21 (eBioscience, cat. n.º 14-8219)
- IL-21 murino a 100 ng/ml (R&D Systems, cat. n.º 594-ML).

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Células de mamífero que expresan CD40L y su uso

<130> 30716 WO

65 <150> EP11190341.5

ES 2 617 488 T3

<151> 23-11-2011

<160> 3

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

```

Met  Ile  Glu  Thr  Tyr  Ser  Gln  Pro  Thr  Pro  Arg  Ser  Val  Ala  Thr  Gly
1          5          10          15

Pro  Ser  Val  Ser  Met  Lys  Ile  Phe  Met  Tyr  Leu  Leu  Thr  Val  Phe  Leu
          20          25          30

Ile  Thr  Gln  Met  Ile  Gly  Ser  Ala  Leu  Phe  Ala  Val  Tyr  Leu  His  Arg
          35          40          45

Arg  Leu  Asp  Lys  Ile  Glu  Asp  Glu  Arg  Asn  Leu  His  Glu  Asp  Phe  Val
          50          55          60

Phe  Met  Lys  Thr  Ile  Gln  Arg  Cys  Asn  Lys  Gly  Glu  Gly  Ser  Leu  Ser
65          70          75          80

Leu  Leu  Asn  Cys  Lys  Glu  Ile  Arg  Ser  Gln  Phe  Glu  Gly  Phe  Val  Lys
          85          90          95

Asp  Ile  Met  Leu  Asn  Lys  Glu  Glu  Pro  Lys  Lys  Glu  Ile  Asn  Phe  Glu
          100          105          110

Met  Gln  Lys  Gly  Asp  Gln  Asp  Pro  Gln  Ile  Ala  Ala  His  Leu  Ile  Ser
          115          120          125

Glu  Ala  Ser  Ser  Lys  Ser  Ser  Ser  Val  Leu  Gln  Trp  Ala  Lys  Lys  Gly
          130          135          140

Tyr  Tyr  Thr  Met  Ser  Asn  Thr  Leu  Val  Thr  Leu  Glu  Asn  Gly  Lys  Gln
145          150          155          160

Leu  Lys  Val  Lys  Arg  Gln  Gly  Phe  Tyr  Tyr  Ile  Tyr  Ala  Gln  Val  Thr

```

ES 2 617 488 T3

				165						170						175
Phe	Cys	Ser	Asn	Gln	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser	
			180					185					190			
Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	
		195					200					205				
Ala	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Thr	Cys	Glu	Gln	Gln	Ser	Ile	His	
	210					215					220					
Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn	
225					230					235					240	
Val	Thr	Asp	Ala	Ser	Gln	Val	Asn	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	
				245					250					255		
Gly	Leu	Leu	Lys	Leu												
			260													

<210> 2
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir un anticuerpo que comprende la etapa de co-cultivar un linfocito B de conejo con una célula CHO o BHK que expresa CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el linfocito B es un linfocito B no maduro.
- 10 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la IL-2 es IL-2 humana y la IL-21 es IL-21 murina.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el linfocito B es un linfocito B depositado individual.
- 15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los linfocitos B son linfocitos B IgG positivos.
6. El método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se une específicamente a un antígeno, que comprende las siguientes etapas:
- 20 a) co-cultivo de una agrupación de linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo o un linfocito B de conejo que secreta anticuerpo individual con células CHO o BHK que expresan CD40L de conejo en presencia de IL-2 e IL-21,
- 25 b) cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica las regiones variables, o una variante humanizada de las mismas, del anticuerpo secretado por el linfocito B de conejo co-cultivado en la etapa a) dentro de uno o más casetes de expresión,
- c) recuperación del anticuerpo desde la célula o el medio de cultivo y producción en virtud de ello de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el método comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una población de linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo obtenida preferentemente de la sangre de un animal experimental,
- 35 b) teñir las células de la población de linfocitos B de conejo con al menos un colorante fluorescente, preferentemente con uno a tres o de dos a tres colorantes fluorescentes.
- c) depositar células individuales de la población de linfocitos B teñida en recipientes individuales, siendo el recipiente preferentemente una placa de múltiples pocillos,
- 40 d) cultivar los linfocitos B de conejo individuales depositados en presencia de células CHO o BHK que expresan CD40L de conejo e IL-2 e IL21,
- e) determinar la unión específica de los anticuerpos secretados en el cultivo de linfocitos B de conejo individuales,
- 45 f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de unión específica por PCR con transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y obteniendo así un dominio variable de cadena ligera o pesada de anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico,
- g) introducir el dominio variable de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica el ácido nucleico o una variante del mismo que codifica una versión humanizada del dominio variable de cadena ligera y/o pesada en un casete de expresión para la expresión de un anticuerpo,
- 50 h) introducir el ácido nucleico en una célula,
- i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo desde la célula o el sobrenadante de cultivo celular, produciendo así un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.
8. Uso de una célula BHK o CHO que expresa CD40L de conejo, IL-2 e IL-21 en el co-cultivo de linfocitos B de conejo que secretan anticuerpo para un crecimiento celular mejorado.

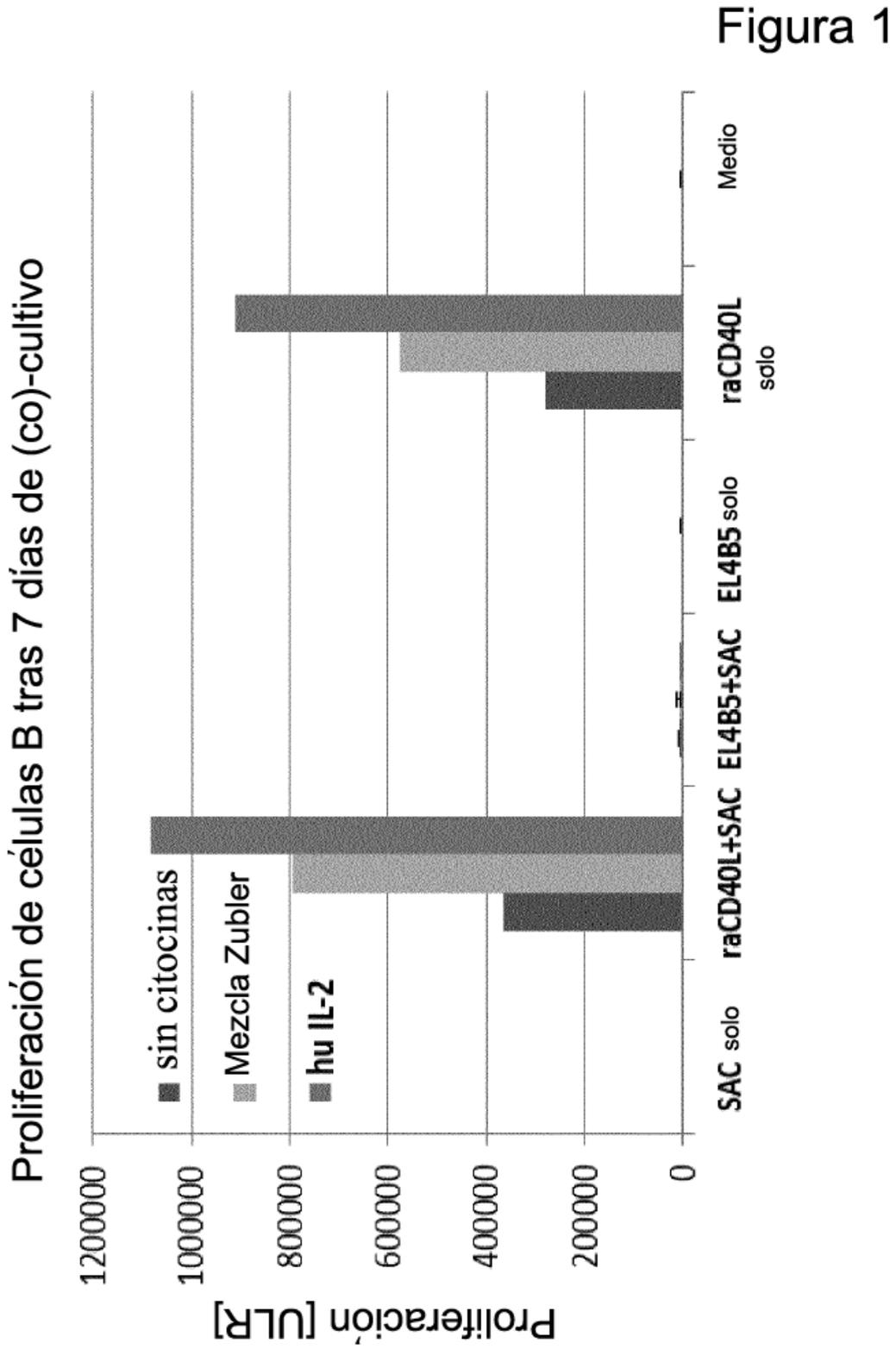
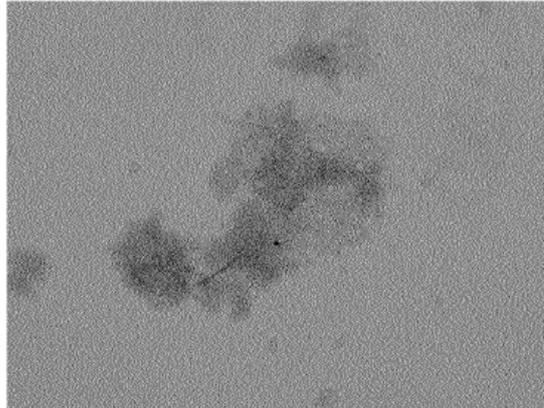


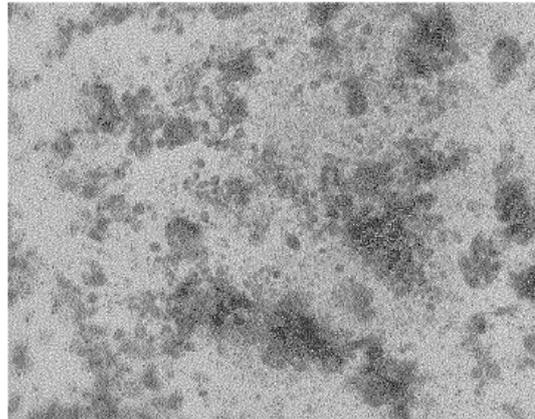
Figura 1

Figura 2

a)



b)



c)

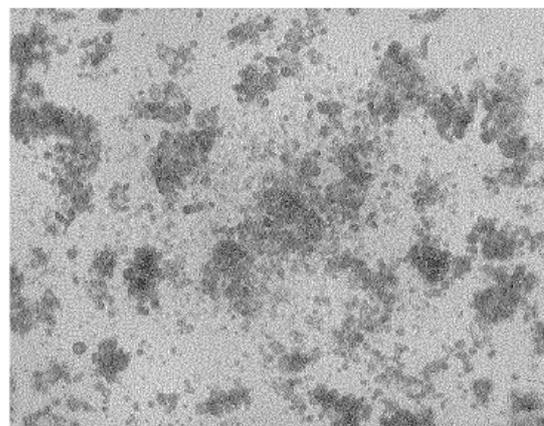
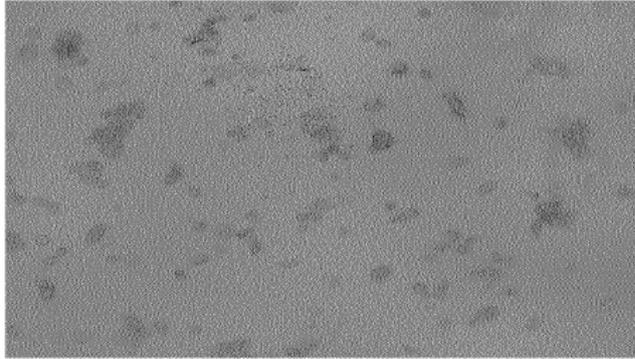
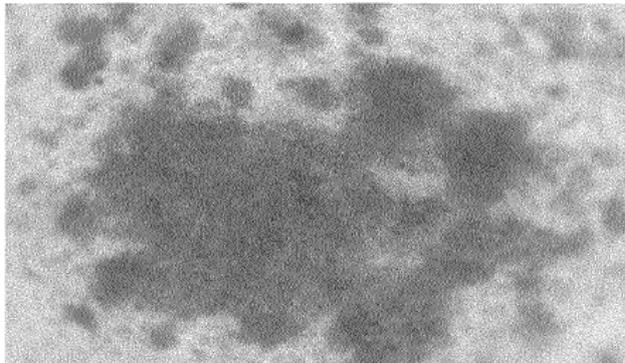


Figura 2

d)



e)



f)



Figura 3

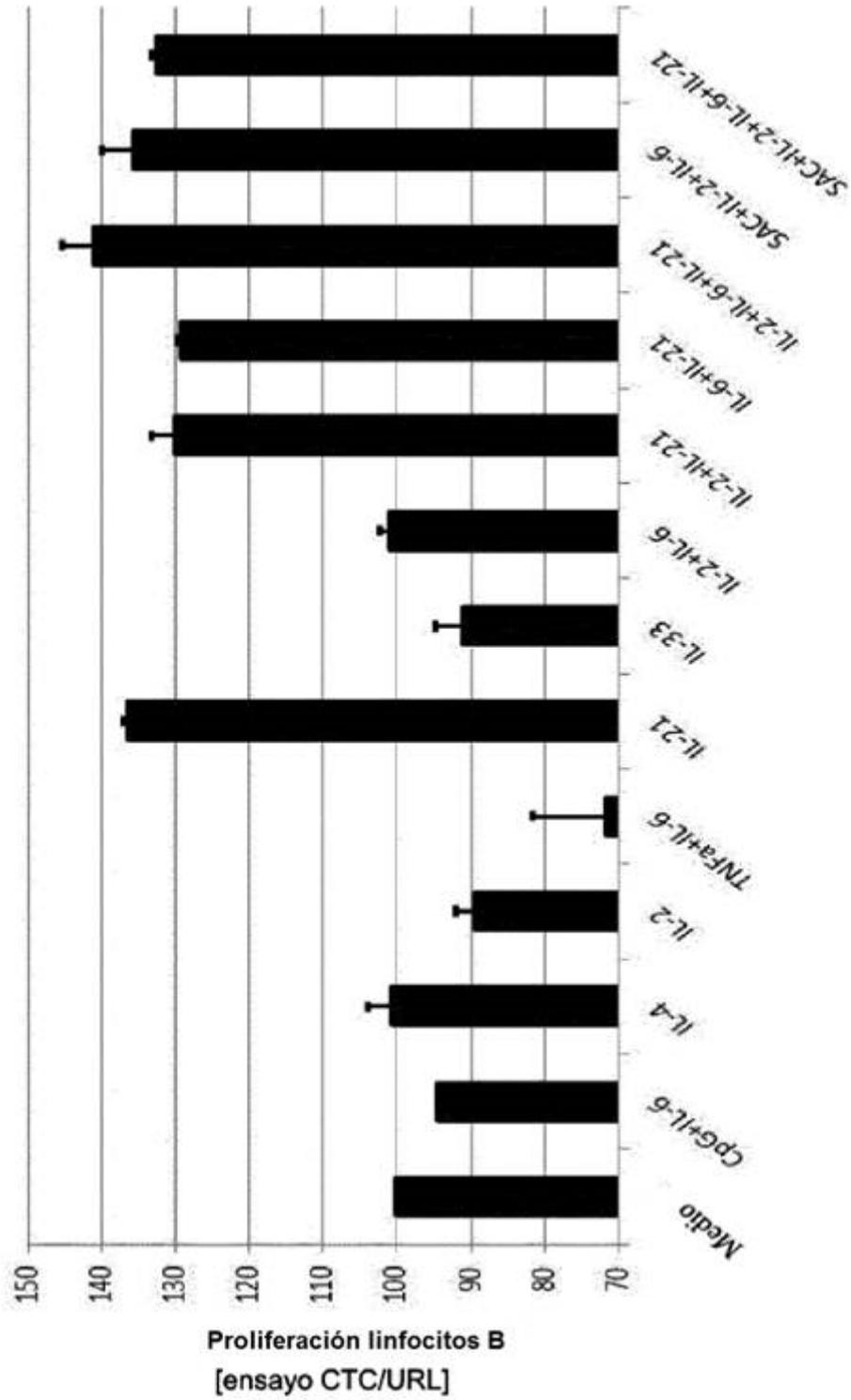


Figura 4

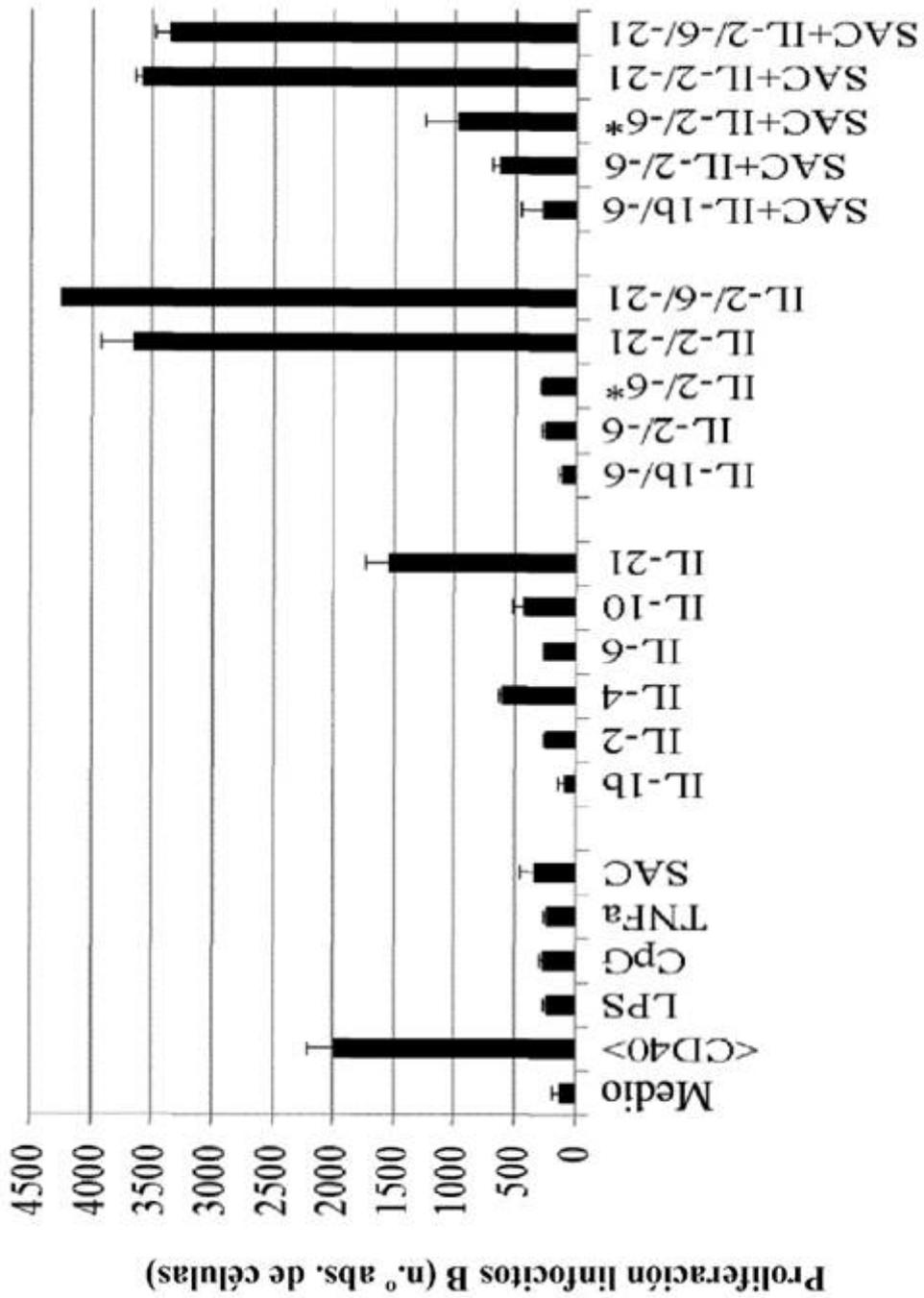


Figura 5

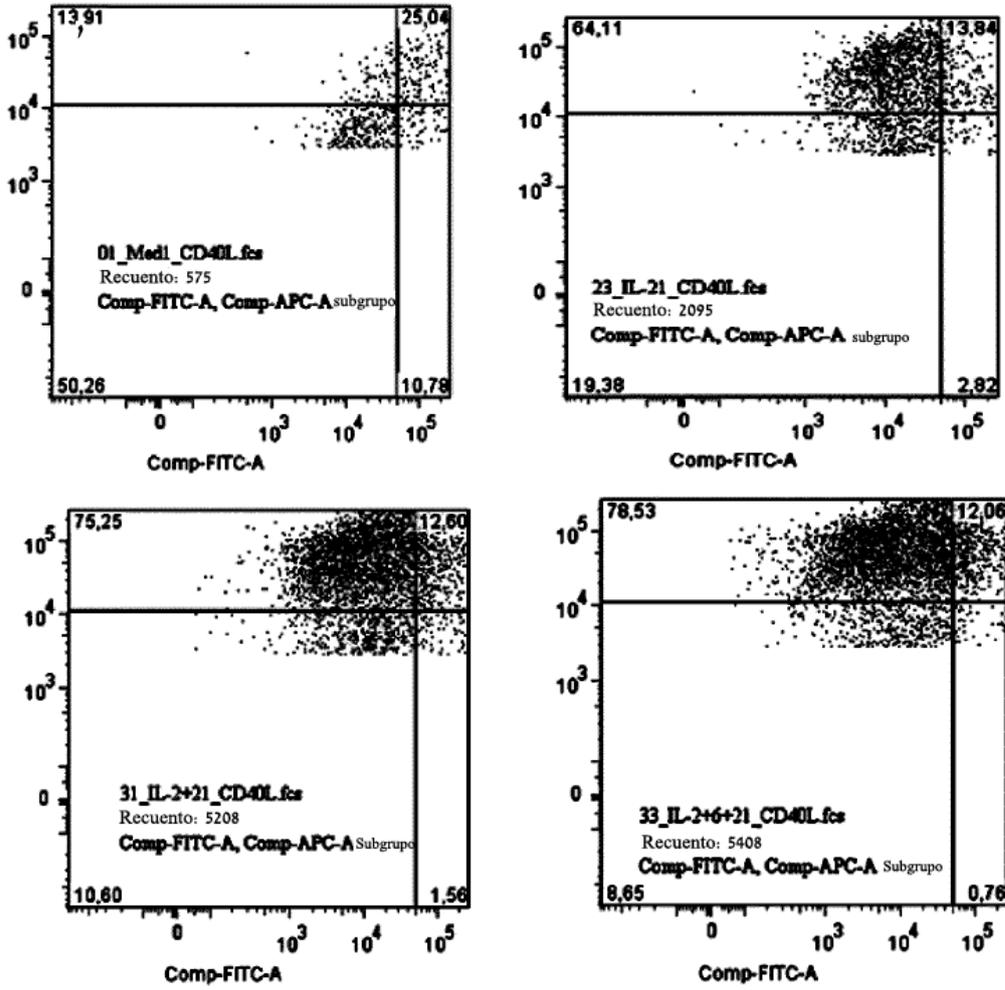
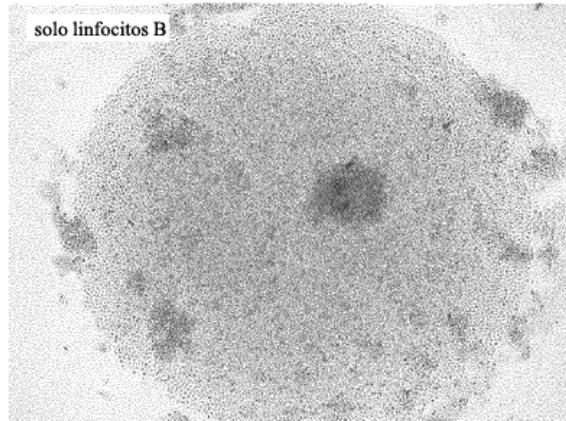
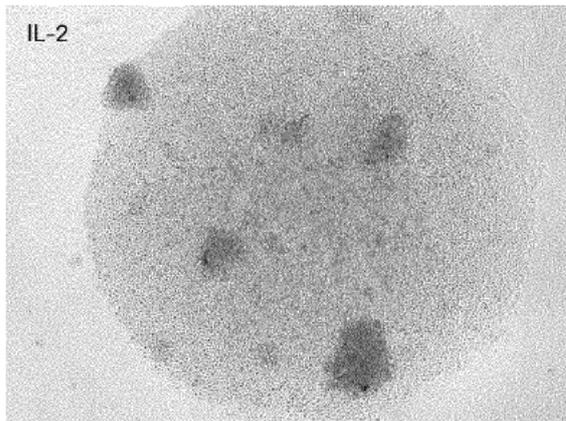


Figura 6

a)



b)



c)

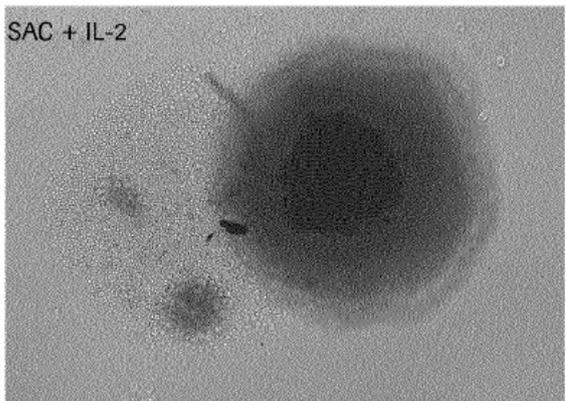


Figura 7

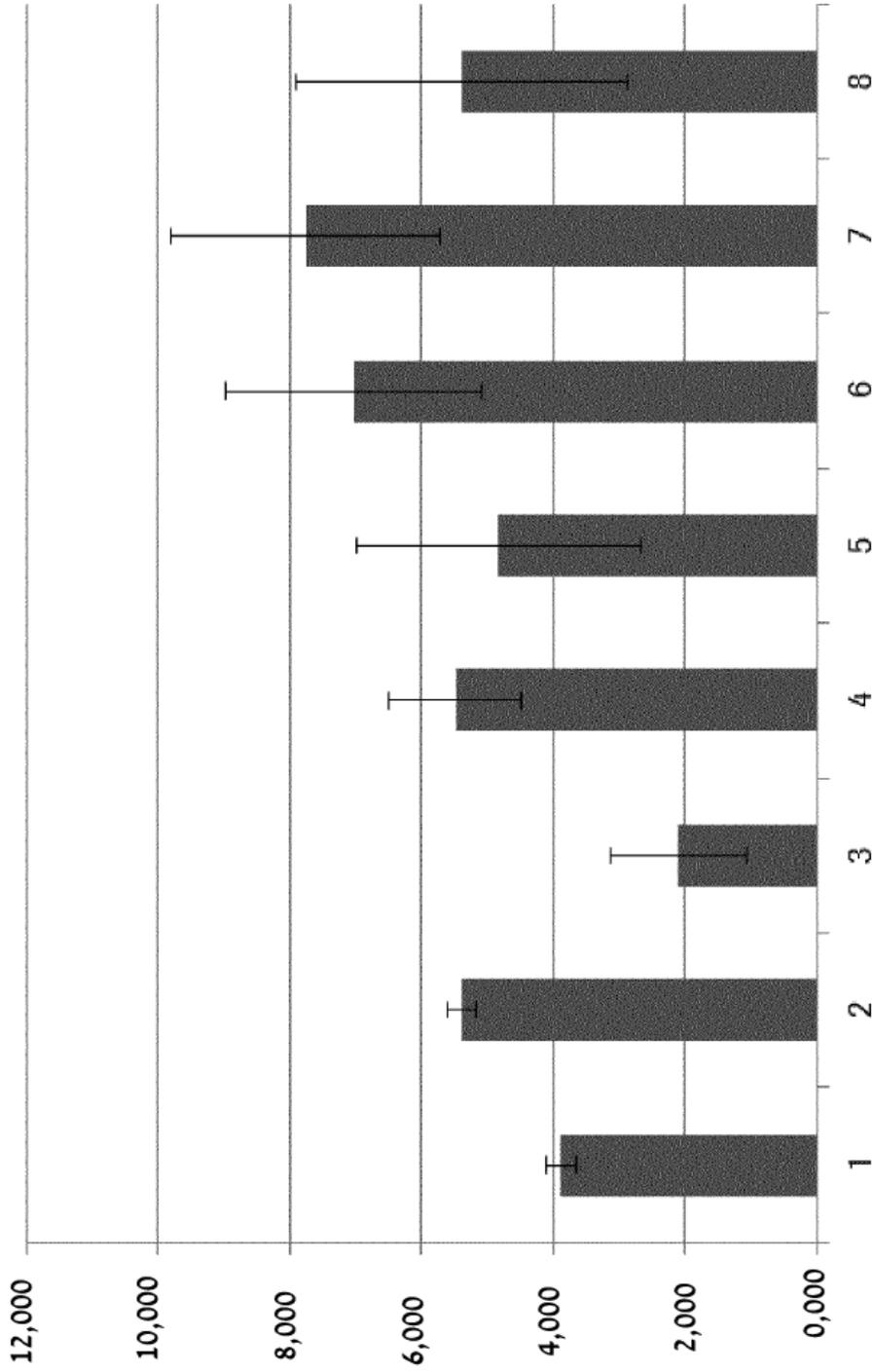


Figura 8

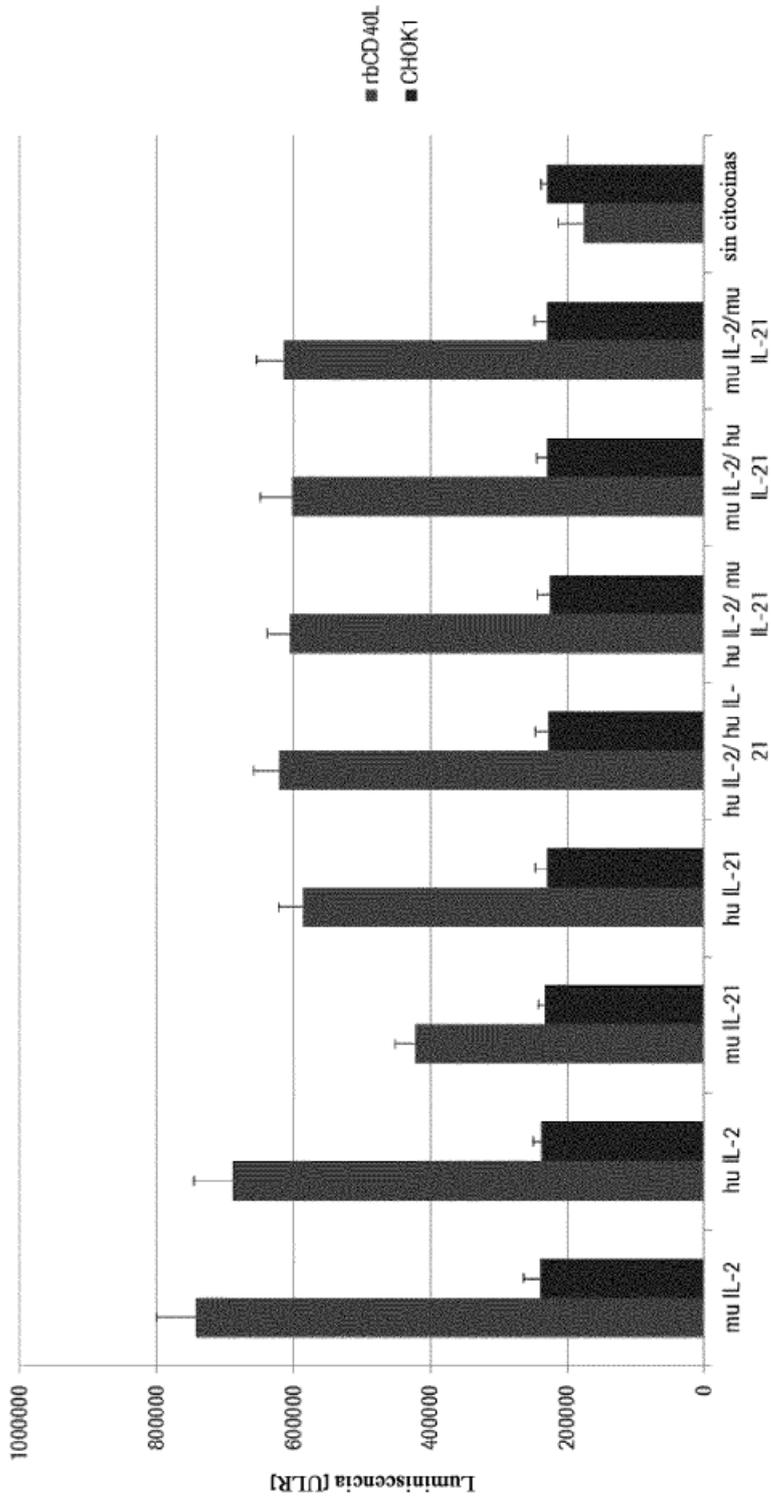


Figura 9

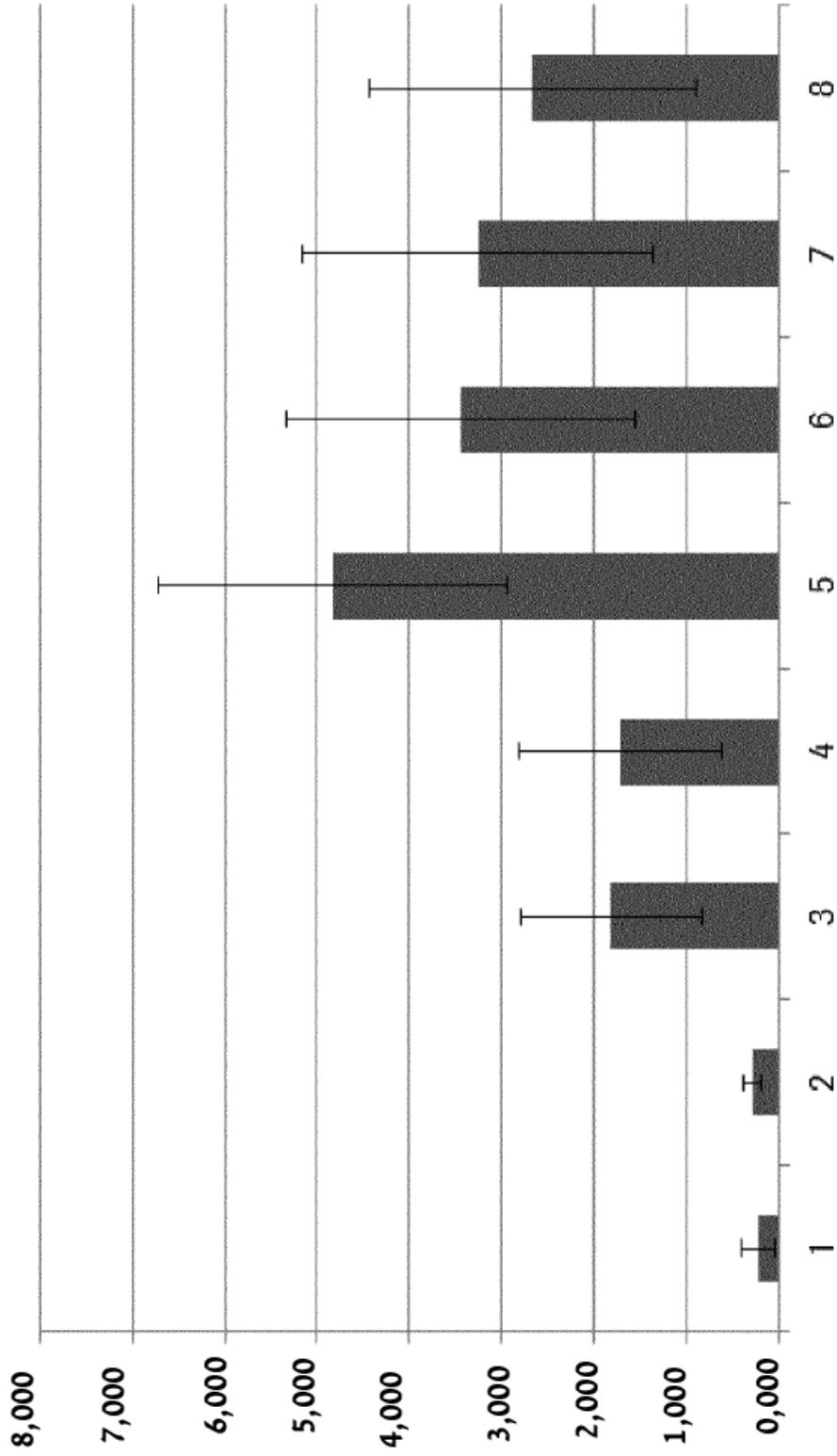


Figura 10

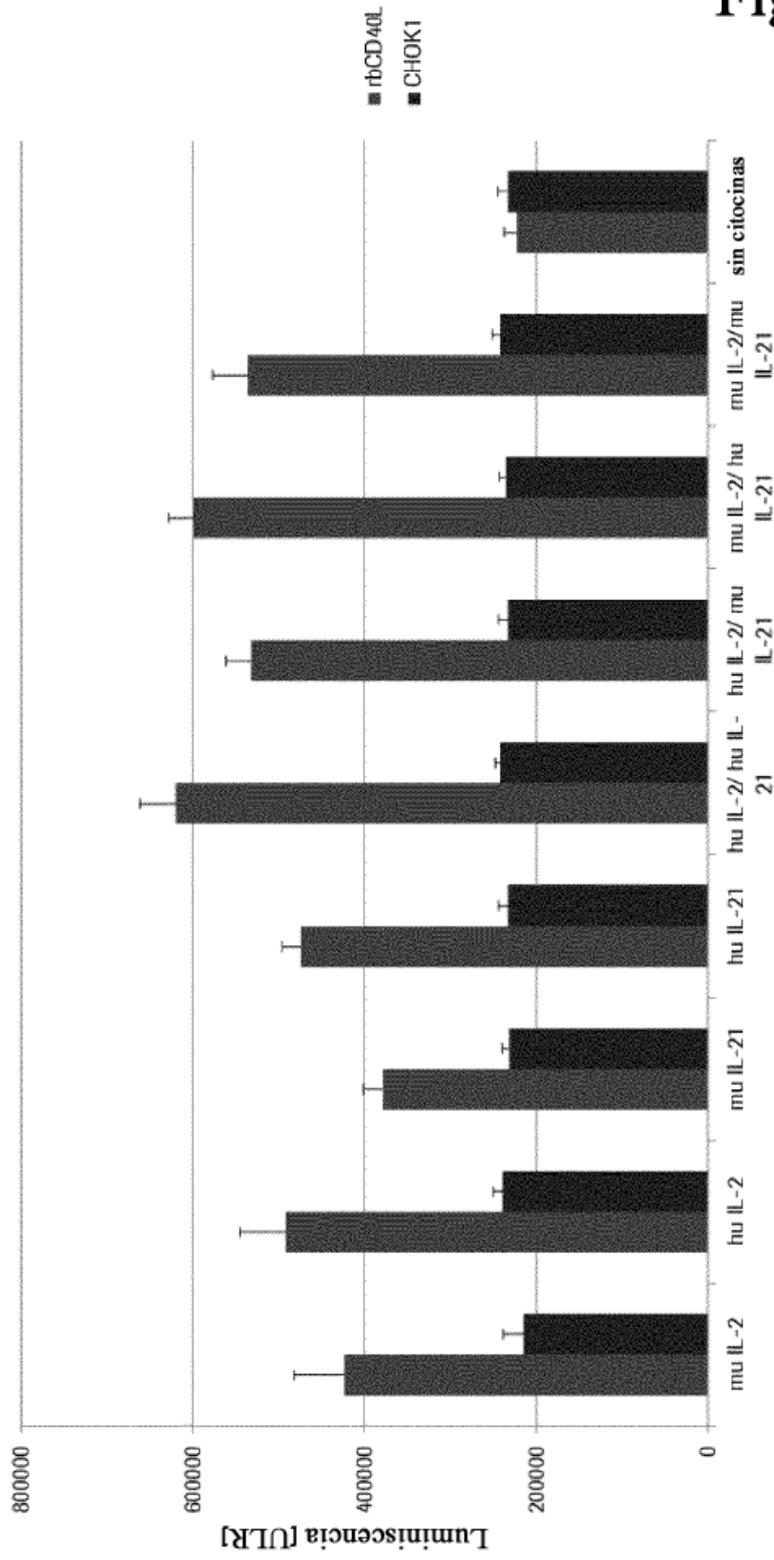


Figura 11

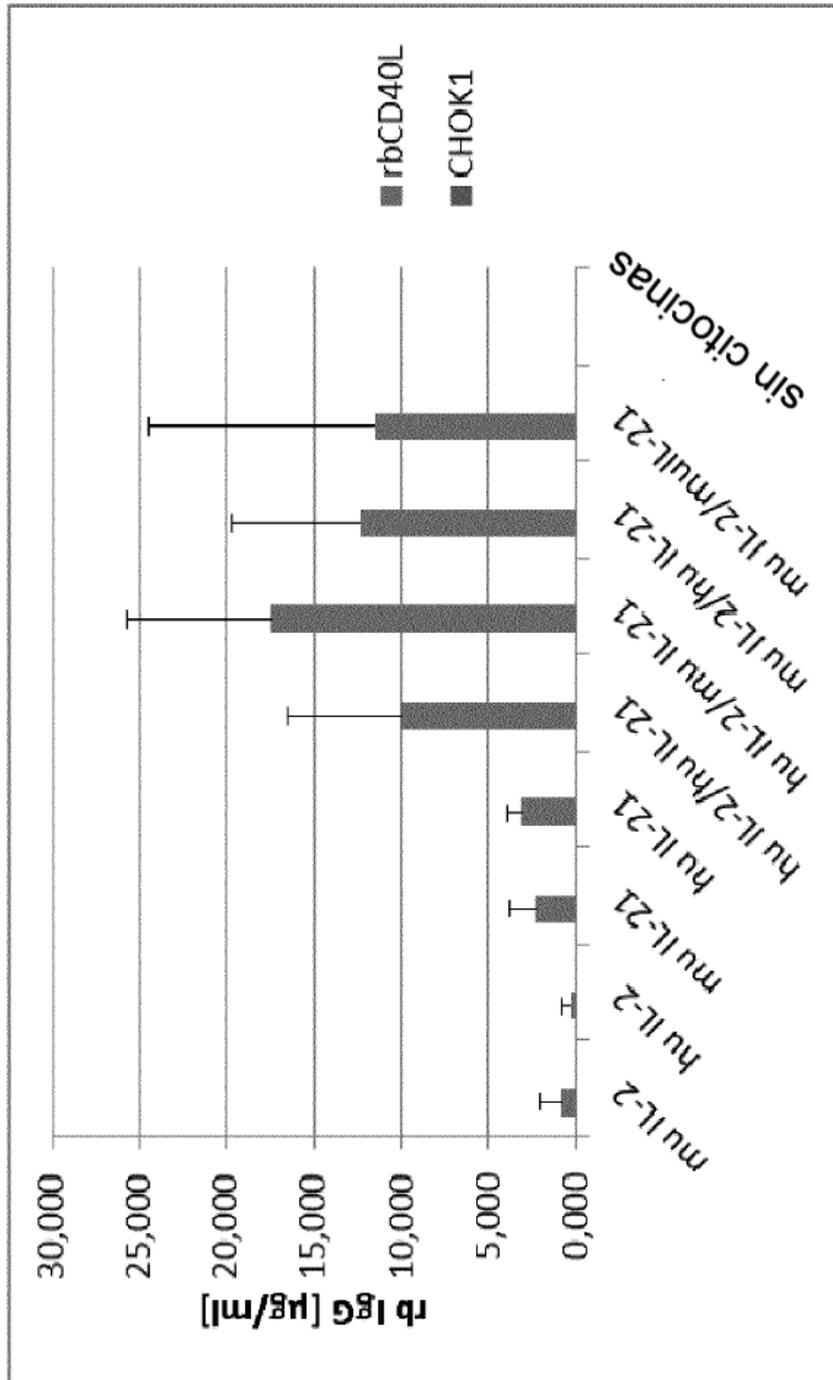


Figura 12

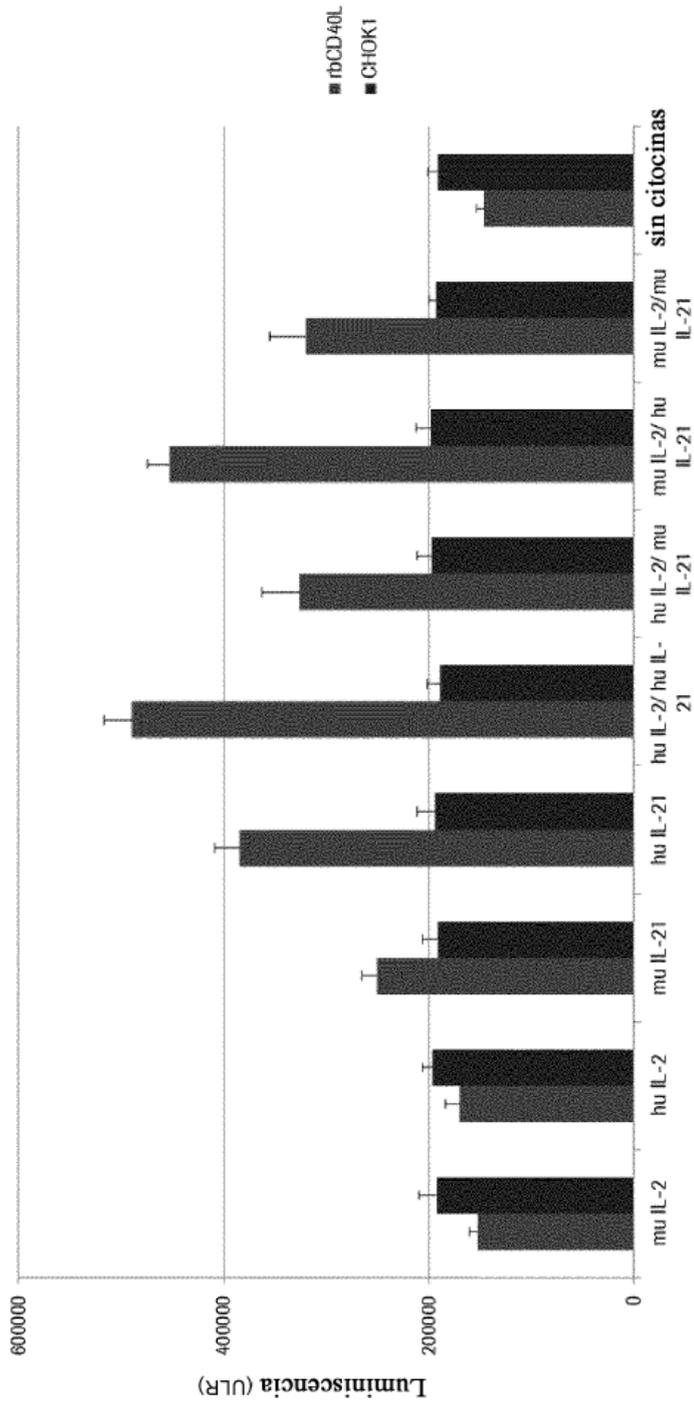


Figura 13

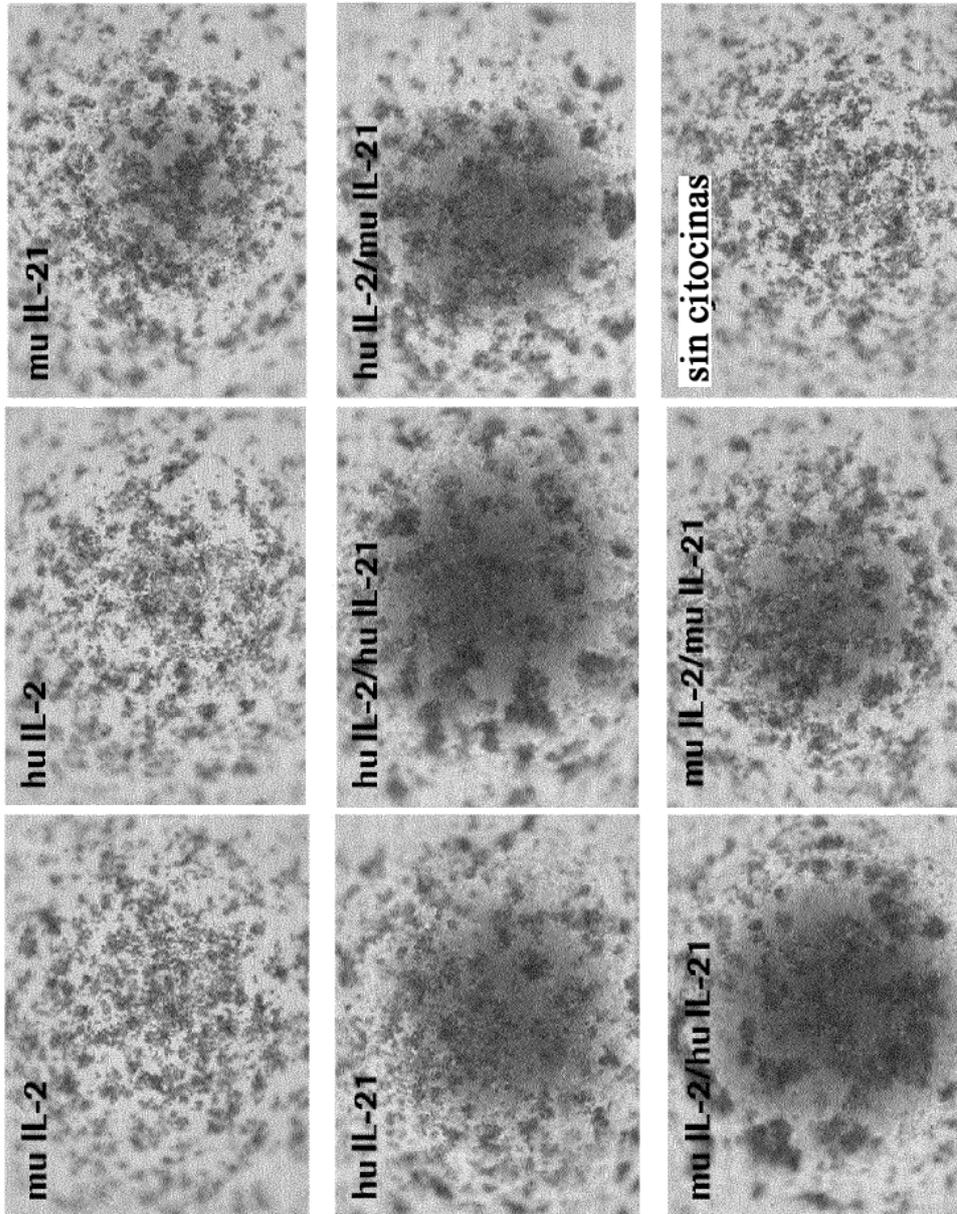


Figura 14

