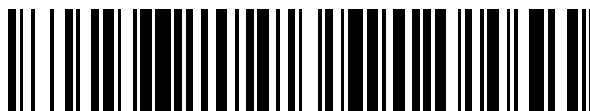


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 671**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2011 PCT/EP2011/071676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11791284 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2646466**

54 Título: **Medios y métodos para producir anticuerpos de alta afinidad**

30 Prioridad:

**02.12.2010 EP 10193562
06.12.2010 US 419909 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

**AIMM THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Meibergdreef 59
1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL**

72 Inventor/es:

**BEAUMONT, TIM;
KWAKKENBOS, MARK JEROEN;
SPITS, HERGEN;
BAKKER, ADRIANUS QUIRINUS y
WAGNER, KOEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 626 671 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

Medios y métodos para producir anticuerpos de alta afinidad

5 La invención se relaciona con el campo de la biología celular. Más específicamente, la invención se relaciona con el campo de la producción de anticuerpos.

10 Los cultivos de linfocitos B *ex vivo* son herramientas importantes en las aplicaciones biológicas y médicas actuales. Una aplicación importante es cultivar células que producen anticuerpos con el fin de cosechar los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales (mAb) representan múltiples copias idénticas de una molécula de anticuerpo única. Entre los beneficios de los mAb está su especificidad para el mismo epítipo sobre un antígeno. Esta especificidad le confiere ciertas ventajas clínicas a los mAb sobre los tratamientos más convencionales mientras que les ofrece a los pacientes una opción de terapia efectiva, bien tolerada con efectos colaterales generalmente bajos. Más aún, los mAb son útiles para investigación biológica y médica.

15 Los linfocitos B maduras se pueden cultivar *in vitro* bajo condiciones que semejan algunos aspectos claves de la reacción del centro germinal (GC), esto es, la activación de los linfocitos B con el ligando (L) CD40 y la presencia de citocinas como la interleucina (IL)-4, IL-10 o IL-21. Mientras que los linfocitos B cultivados con CD40L, IL-2 e IL-4 producen muy poco Ig, la adición de IL-21 conduce a la diferenciación de las células de plasma acompañadas por alta secreción de Ig. Aunque este sistema *in vitro* ha probado ser útil para estudiar algunos aspectos de la diferenciación del linfocito B, tanto las IgD + los linfocitos B y los linfocitos B de memoria IgD conmutados eventualmente se diferencian en las células de plasma terminalmente diferenciadas, que están acompañadas por la detención del ciclo celular que precluye la generación de líneas celulares positivas BCR específicas de antígeno de largo plazo.

20 Recientes avances han suministrado comprensión en como múltiples factores de transcripción, incluyendo la proteína 1 de maduración inducida por linfocito B (BLIMP1) y el linfoma de linfocito B (BCL) 6 controla el desarrollo de los linfocitos B GC en células de plasma productoras de anticuerpo terminalmente detenidas. El represor BCL6 transcripcional ha mostrado evitar la diferenciación de las células de plasma. El BCL6 es altamente expresado en linfocitos B GC donde este facilita la expansión de linfocitos B al subregular p53 y evitar la diferenciación prematura de las células GC en las células de plasma mediante BLIMP1 negativamente regulante.

25 Un método mejorado para generar un linfocito B similar a plasmablasto que produce anticuerpo fue descrito recientemente en el documento WO 2007/067046. De acuerdo con este método, la cantidad de BCL6 y un miembro de la familia Bcl-2, preferiblemente Bcl-xL, se modulan en un linfocito B, preferiblemente un linfocito B de memoria, para generar un linfocito B similar a plasmablasto que produce anticuerpo. En el documento WO 2007/067046 la cantidad de BCL6 y/o el producto de expresión Bcl-xL están directa o indirectamente influenciados. Preferiblemente las cantidades de los productos de expresión tanto el BCL6 como el Bcl-xL dentro de dicha célula productora de anticuerpo se incrementan, ya que ambos productos de expresión están involucrados en la estabilidad de un linfocito B productor de anticuerpo. Dicho Bcl-xL es un miembro de la familia Bcl-2 antiapoptótica. Los procesos que son controlados por la familia Bcl-2, que incluyen tanto proteínas pro como antiapoptóticas, se relacionan con la senda mitocondrial de la apoptosis. Esta senda procede cuando las moléculas secuestradas entre las membranas mitocondriales exterior e interior se liberan en el citosol mediante la permeabilización de la membrana exterior mitocondrial. Los miembros de la familia proapoptótica se pueden dividir en dos clases. Las moléculas efectoras Bax y Bak, que contienen los así llamados dominio 3 (BH3) de Homología Bcl-2, están involucrados en permeabilizar la membrana mitocondrial exterior al formar poros proteolípidos; las proteínas de solo BH3 proapoptóticas (Bad, Bik, Bim, Bid, Hrk, Bmf, bNIP3, Puma y Noxa) funcionan bajo diferentes tensiones celulares mediante interacciones proteína-proteína con otros miembros de la familia Bcl-2 (antiapoptótica)

30 Los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptótica Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 y Mcl-1 están generalmente integrados con la membrana mitocondrial exterior. Ellos se unen directamente e inhiben las proteínas Bcl-2 proapoptóticas para proteger la integridad de la membrana mitocondrial.

35 En tal método se prefiere adicionalmente que dicho linfocito B similar a plasmablasto que produce anticuerpo se incuba con IL 21 y CD40L. Un linfocito B, tal como un linfocito B similar a plasmablasto que produce anticuerpo, es preferiblemente cultivado en la presencia de CD40L ya que la replicación de la mayoría de los linfocitos B esta favorecida por el CD40L. Se prefiere adicionalmente que el STAT3 se active en dicho linfocito B productor de anticuerpo. La activación del STAT3 se puede lograr de una variedad de maneras. Preferiblemente, el STAT3 se activa al suministrar una célula productora de anticuerpo con una citocina. Las citosinas, están naturalmente involucradas en la diferenciación del linfocito B, son muy efectivas en regular las proteínas STAT. Los activadores muy efectivos del STAT3 son IL 2, IL 10, IL 21 e IL 6, pero también IL 7, IL 9, IL 15, IL 23 e IL 27 son conocidos por activar el STAT 3. Adicionalmente, o alternativamente, la activación del STAT 3 se logra al transferir al linfocito B de un ácido nucleico que codifica un mutante de STAT 3 que confiere activación constitutiva al STAT 3. (Sean A Diehl, Heike Schmidlin, Maho Nagasawa, Simon D van Haren, Mark J Kwakkenbos, Etsuko Yasuda, Tim Beaumont, Ferenc A Scheeren, Hergen Spits
60 STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation J Immunol 2008 vol. 180 (7) pp. 4805-15)

Más preferiblemente se utiliza IL 21, ya que el IL 21 es particularmente adecuado para influenciar la estabilidad de un linfocito B similar a plasmablasto productor de anticuerpo. Además de la regulación hacia arriba del STAT 3, el IL 21 es capaz de regular hacia arriba la expresión Blimp 1 aun cuando la expresión del Blimp 1 es contrarrestada por el BCL6. Con los métodos divulgados en el documento WO 2007/067046, se ha vuelto posible incrementar el periodo de vida replicativo de una célula productora de anticuerpo ya que es posible mantener un linfocito B en una etapa de desarrollo donde ocurre la replicación. En cultivos de linfocito B *ex vivo* tempranos el periodo de vida replicativo fue de unas pocas semanas a dos meses. Durante este tiempo las células cultivadas perdieron su capacidad de replicarse y murieron. Con un método como el que se divulgó en el documento WO 2007/067046, sin embargo, se ha vuelto posible prolongar el periodo de vida replicativo de unos linfocitos B de memoria que producen anticuerpo, de tal manera que se generan cultivos *ex vivo* que comprenden linfocitos B similares a plasmablasto que son capaces de replicar y producir anticuerpo.

Aunque estos métodos posibilitan la producción de anticuerpos que apuntan eficientemente a un antígeno de interés, se desea a menudo la mejora de las características del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. Las características de unión son por lo tanto regularmente alteradas al introducir mutaciones en el ácido nucleico codificante, preferiblemente en la región codificante CDR, y ensayar los anticuerpos resultantes. Esto es, sin embargo, consumidor de tiempo. Por lo tanto se desean métodos alternativos para obtener anticuerpos de alta afinidad.

Es un objeto de la presente invención suministrar métodos para producir y/o seleccionar anticuerpos de alta afinidad.

La invención suministra medios y métodos para obtener una población de linfocito B, iniciando desde un cultivo de linfocito B, cuya población tiene una capacidad de unión promedio mayor que el cultivo de linfocito B original. Preferiblemente, se produce una población de linfocito B monoclonal, partiendo de un cultivo de linfocito B monoclonal. La invención suministra una manera simple y elegante de obtener poblaciones de linfocitos B con una capacidad de unión promedio incrementada, sin la necesidad de técnicas de mutación laboriosas.

La invención suministra un método de acuerdo a las reivindicaciones para producir anticuerpos específicos para un antígeno de interés.

Dentro de una población de linfocitos B monoclonales capaces de producir anticuerpo específico para un antígeno de interés, es posible seleccionar, en la etapa e) de un método de acuerdo con la invención, al menos 1, opcionalmente más de 1, tal como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25 o 50 linfocitos B con una capacidad de unión para dicho antígeno de interés que es mayor que la capacidad de unión promedio de dicha población de linfocitos B de dicho antígeno de interés. Tales linfocitos B con una capacidad de unión superior para un antígeno de interés que la capacidad de unión promedio de la población de linfocitos B para dicho antígeno de interés se denominan aquí "linfocitos B de alta afinidad". Una posible razón para una diferencia en la capacidad de unión entre los linfocitos B múltiples en una población monoclonal de linfocitos B es que la expresión del BCR varía entre los linfocitos B en dicha población. Un linfocito B con una expresión relativamente alta de BCR unirá más antígeno de interés que un linfocito B con una expresión relativamente baja de BCR. Sin embargo, se espera que anticuerpos producidos mediante los linfocitos B con diferente expresión del BCR, tenga la misma afinidad de unión. Los presentes inventores de manera sorprendente encontraron que, además de una expresión BCR relativamente alta, una colección de linfocitos B de alta afinidad producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés que une dicho antígeno con una afinidad mayor que la afinidad promedio de los anticuerpos producidos por dicha población de los linfocitos B. Aún de manera más sorprendente, los inventores encontraron que los cultivos de linfocito B obtenidos con un método de la invención contenían células que se unen a antígeno con una mayor afinidad que el linfocito B promedio en el cultivo original. Los linfocitos B únicos se pueden así aislar de una población de linfocitos B dadas sobre la base de su capacidad de unión mayor mediante los métodos conocidos en la técnica y se pueden expandir a una nueva población de linfocitos B en al menos tres semanas. Estos nuevos linfocitos B producen anticuerpos que tienen una alta afinidad que los anticuerpos producidos por la población de linfocitos B original que los nuevos linfocitos B de los que se derivan. Este hallazgo es contrario a las expectativas ya que una persona experta en la técnica esperaría que después del aislamiento de un linfocito B (subclon) de una población ya monoclonal de dichos linfocitos B, la afinidad por el antígeno del anticuerpo producido por la progenie del subclon de dicha población de linfocito B ya monoclonal regresará a la afinidad promedio para el antígeno, comparable a la afinidad promedio de la población de linfocitos B de los cuales se seleccionó al menos un linfocito B.

Así, en una realización en la etapa a) de un método de acuerdo con la invención preferiblemente se selecciona un linfocito B único, por ejemplo de una población policlonal de linfocitos B. El linfocito B único es posteriormente expandido en una población monoclonal de linfocitos B en las etapas b) a d). Esto se logra por ejemplo utilizando un método como se describió en el documento WO 2007/067046, que se discutió aquí anteriormente. De esta manera, se obtiene la etapa d), una línea de linfocitos B monoclonales específica para un antígeno de interés. En principio, todos los linfocitos B en las líneas de linfocito B monoclonales producen esencialmente los mismos anticuerpos específicos para dicho antígeno, aunque pequeñas diferencias en afinidad para dicho antígeno pueden estar presentes entre las células de dicha línea de linfocitos B monoclonales, es decir, algunos linfocitos B en la población monoclonal produce anticuerpos con una afinidad que es ligeramente superior que la afinidad promedio y algunos linfocitos B en la población monoclonal producen anticuerpos con una ligera afinidad inferior. La población de linfocitos B se convierte en ligeramente heterogénea de nuevo. En la etapa e), al menos uno de tales linfocitos B con una mayor afinidad que la afinidad promedio se selecciona de la línea de linfocitos B monoclonal. En la etapa f) el linfocito B o los linfocitos B

seleccionados en la etapa e) son posteriormente cultivados en una segunda línea de linfocitos B, preferiblemente monoclonal. La presente invención suministra la comprensión de que esta segunda línea de linfocitos B, preferiblemente monoclonales, tiene una afinidad promedio que es mayor que la afinidad promedio de la población de linfocitos B monoclonales originales obtenida en la etapa d). Como se describió anteriormente, fue sorprendente encontrar que la alta afinidad de los linfocitos B seleccionados se mantuvo después del cultivo, aún si el cultivo tiene lugar durante un periodo de tiempo prolongado, en lugar de regresar a la afinidad promedio de la población original. Así, la segunda población monoclonal de los linfocitos B cultivados en la etapa f) tiene una afinidad promedio mayor para el antígeno que la población de linfocitos B monoclonales cultivados en la etapa d). De manera similar, la afinidad de la mayoría de los linfocitos B en la segunda población monoclonal de la etapa f) es mayor que la afinidad de la mayoría de los linfocitos B en una población monoclonal de la etapa d).

Se suministra un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir anticuerpos específicos para un antígeno de interés. Se obtienen anticuerpos los cuales tienen una afinidad por dicho antígeno de interés que es mayor que la afinidad promedio por dicho antígeno de interés de los anticuerpos producidos mediante los linfocitos B de dicha primera línea de linfocitos B monoclonales.

En otra realización, se selecciona más de un linfocito B en la etapa a) de un método de la invención, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25, 50 o 100 linfocitos B. Los linfocitos B son por ejemplo seleccionados de una población policlonal de linfocitos B o de una muestra biológica. Los linfocitos B seleccionados son posteriormente expandidos en una población de linfocitos B en las etapas b) a d), por ejemplo utilizando un método descrito en el documento WO 2007/067046. La población de linfocitos B obtenida es así una (segunda) población de linfocitos B policlonales. Posteriormente, y antes de la etapa e) se lleva a cabo un método de la invención, se produce preferiblemente una población monoclonal de linfocitos B. Esto es hecho por ejemplo al seleccionar un linfocito B único de dicha (segunda) población policlonal de linfocitos B utilizando Clasificación de Célula Activada por Fluorescencia o limitando la dilución, lo cual se explica adelante, y expandiendo dicho linfocito B único seleccionado a una población monoclonal de linfocitos B. Luego, en la etapa e) se lleva a cabo un método de la invención, en el cual al menos un linfocito B con una mayor afinidad que la afinidad promedio en la cual se selecciona al menos un linfocito B con una mayor afinidad que la afinidad promedio de la población de linfocitos B monoclonales. En la etapa f) el linfocito B o los linfocitos B seleccionados en la etapa e) son posteriormente cultivados en una segunda línea de linfocitos B monoclonales, después de lo cual se obtienen los anticuerpos producidos mediante dicha segunda línea de linfocitos B monoclonales en la etapa g).

Un método como se describió aquí permite obtener anticuerpos de alta afinidad, mejorados, preferiblemente anticuerpos monoclonales, sin el uso de técnicas recombinantes. Antes de la presente invención, la afinidad de los anticuerpos (monoclonales) se incrementó utilizando tales técnicas recombinantes. La secuencia del ácido nucleico que codifica el anticuerpo requiere primero ser determinada. Posteriormente se introducen una o más mutaciones en la secuencia del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Luego, los genes que contienen una o más mutaciones requieren ser expresados en una célula seguidos por la producción de anticuerpos en las células productoras. Finalmente, el anticuerpo mutado tiene que ser ensayado por su capacidad de unión al antígeno de interés con el fin de determinar si se obtuvo anticuerpo con la afinidad mejorada para dicho antígeno comparado con el anticuerpo no mutado. Tal proceso para mejorar la afinidad de un anticuerpo es elaborado y consume tiempo. El método de acuerdo con la presente invención permite la producción del anticuerpo de alta afinidad en un proceso directo y menos elaborado sin necesidad de ingeniería molecular.

En una realización de la invención, después de la etapa de seleccionar al menos un linfocito B de alta afinidad de dicha población ya monoclonal de linfocitos B (etapa e) del método de la invención como se describió anteriormente, dicho al menos un linfocito B de alta afinidad es permitido para expandirse en una población de linfocitos B, preferiblemente una línea de linfocitos B monoclonales, de nuevo, después de lo cual se efectúa otra etapa de seleccionar al menos un linfocito B de alta afinidad de dicha nueva población de linfocitos B, preferiblemente de dicha nueva línea de linfocitos B monoclonal. Al repetir las etapas de permitir la expansión del linfocito B seleccionado en una población y seleccionar al menos un linfocito B sobre la base de su capacidad de unión para el antígeno, es decir, repetir las etapas d) y e), es posible generar células B que producen anticuerpo de alta afinidad. Preferiblemente, al repetir las etapas de expansión y selección como se describió anteriormente, es posible incrementar con cada ciclo de selección la afinidad del anticuerpo producido mediante la población de linfocito B resultante para el antígeno de interés.

Se suministra así un método que comprende luego de la etapa e) del método de la invención, repetir la etapa de permitir la expansión de al menos un linfocito B de alta afinidad seleccionado en una población de linfocitos B, preferiblemente una línea de linfocitos B monoclonal, y seleccionar de nuevo al menos un linfocito B de alta afinidad, es decir, repetir las etapas d) y e) de un método de la invención al menos una vez. Dichas etapas son por ejemplo repetidas una vez, pero preferiblemente dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o aún más veces.

En una realización se suministra un método de la invención en donde dicho al menos un linfocito B seleccionado en la etapa e) se cultiva durante al menos cuatro semanas. Preferiblemente dicho al menos un linfocito B seleccionado en la etapa e) se cultiva en al menos seis semanas, más preferiblemente durante al menos nueve semanas, más preferiblemente durante al menos tres meses, más preferiblemente durante al menos seis meses.

5 Sin estar ligados a ninguna teoría, se considera que las diferencias en la afinidad de los anticuerpos para el antígeno de
interés dentro de una población de linfocitos B monoclonales pueden resultar de procesos mediados por Citidina
Deaminasa Inducida por Activación (AID). Los linfocitos B de memoria y primitivos activados por antígeno en el centro
germinal sufren de proliferación extensiva, acompañados por hipermutaciones somáticas (SHM) y recombinación
conmutada de clase (CSR) de los genes Ig mediados por AID. El aire desamina los residuos de desoxicitidina en genes
de inmunoglobulina, lo que dispara la diversificación del anticuerpo. Se demostró en la solicitud de patente US
2008305076 que el IL 21 induce la expresión de BLIMP, BCL6 y AID, pero no induce directamente hipermutación
10 somática. Sin embargo, los presentes inventores encontraron que el AID se expresa en los linfocitos B que son
cultivadas de acuerdo a un método como se describió aquí. La expresión del AID en (un linfocito B que se desarrollará)
un anticuerpo que produce linfocitos B permite la generación de inmunoglobulinas novedosas que albergan mutaciones
que no estaban presentes en el linfocito B original antes de la transducción con BCL6 y un ácido nucleico antiapoptótico.
Así, cultivar un linfocito B en los cuales se indujo hipermutación somática mediante la expresión del AID permite a la
generación de variantes de inmunoglobulina los cuales, por ejemplo, tienen una mayor o menor afinidad por un antígeno
de interés, o que son más estables, por ejemplo, en una solución acuosa o bajo condiciones salinas incrementadas, o
15 cualquier combinación de las mismas.

Luego de la selección de al menos un linfocito B de alta afinidad dicha población de linfocitos B, AID y aún expresados
dentro de dicho seleccionado al menos un linfocito B. Por lo tanto, después de la selección de tal linfocito B, el AID en
dicho linfocito B aún permite la introducción de mutaciones en el gen de inmunoglobulina de la progenie de dicho
20 linfocito B. Las hipermutaciones somáticas en los genes de inmunoglobulina ocurren preferiblemente en la región CDR3
de los genes Ig. Las mutaciones introducidas en la región CDR3 de la inmunoglobulina es más probable que resulten en
la afinidad de unión reducida o perdida para un antígeno de dicha inmunoglobulina que en una afinidad de unión
incrementada. Los presentes inventores, sin embargo, encontraron una afinidad de unión incrementada.

25 Como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico antiapoptótico" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de retrasar
y/o evitar la apoptosis en un linfocito B. Dicho ácido nucleico antiapoptótico es capaz de retrasar y/o evitar la apoptosis
en un linfocito B que produce anticuerpo. Se utiliza un ácido nucleico antiapoptótico el cual comprende un ácido nucleico
exógeno. Esto significa que se utiliza una secuencia de ácido nucleico que no es naturalmente expresada en los
linfocitos B, o que se utiliza una copia adicional de un ácido nucleico de ocurrencia natural, de tal manera que la
30 expresión en los linfocitos B resultantes se mejora comparada con los linfocitos B naturales. Varios ácidos nucleicos
antiapoptóticos son conocidos en la técnica. Se utiliza un ácido nucleico el cual es un miembro antiapoptótico de la
familia Bcl-2, por que las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas son buenos inhibidores de la apoptosis. Muchos procesos que
son controlados por la familia Bcl-2 cuya familia incluye tanto proteínas pro como antiapoptóticas (se relacionan con la
senda mitocondrial de la apoptosis), como se subraya con más detalle adelante. Los miembros de la familia Bcl-2
35 antiapoptótica Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 y Mcl-1 se integran generalmente con la membrana mitocondrial exterior. Ellos se
unen directamente e inhiben las proteínas proapoptóticas que pertenecen a la familia Bcl-2 para proteger la integridad
de la membrana mitocondrial.

40 En un método de acuerdo con la invención dicho ácido nucleico antiapoptótico codifica Bcl-xL. Una combinación de los
ácidos nucleicos BCL6 y Bcl-xL es particularmente adecuada para inmortalizar los linfocitos B y el cultivo de largo plazo
de los linfocitos B similares a plasmablastos resultantes. Una combinación de BCL6 y Bcl-xL estabiliza los linfocitos B
particularmente bien.

45 Una población de linfocitos B de acuerdo con la invención preferiblemente es una población monoclonal de linfocitos B.
Un ejemplo de una población de linfocitos B de acuerdo con la invención es una línea celular de linfocitos B,
preferiblemente linfocitos B monoclonales. De esta manera, una población de linfocitos B de acuerdo con la invención es
más preferiblemente una línea de linfocitos B monoclonales. Permitir la expansión de dichos linfocitos B en una
población de dichos linfocitos B se logra por ejemplo al cultivar dichos linfocitos B hasta que se obtiene una población de
dichos linfocitos B.
50

Dentro de una población de linfocitos B, aún en una población de linfocitos B monoclonales, la capacidad de unión de
los BCR de los linfocitos B de dicha población, y la capacidad de unión de los anticuerpos producidos por los linfocitos B
de dicha población, no es igual, en su lugar existe una variación en dicha capacidad de unión. La capacidad de unión
promedio de la población de linfocitos B se define aquí como el promedio de la capacidad de unión o la afinidad
55 promedio del BCR y/o anticuerpo de todos los linfocitos B individuales en dicha población. La afinidad promedio para un
antígeno de interés de un anticuerpo producido mediante un linfocito B o mediante una población de linfocitos B se
define aquí como el promedio de las afinidades para dicho antígeno de interés de los anticuerpos producidos por todos
los linfocitos B individuales en dicha población. Un linfocito B de alta afinidad de una población de linfocitos B,
preferiblemente de una línea de linfocito B monoclonal, de acuerdo con la invención se selecciona preferiblemente del
60 40% superior de los linfocitos B de una población, preferiblemente de una línea de linfocitos B monoclonal, con respecto
a la capacidad de unión y/o afinidad, preferiblemente del 30% superior de los linfocitos B de dicha población y de la
línea de linfocito B monoclonal, más preferiblemente del 25% superior de los linfocitos B de dicha población o la línea de
linfocito B monoclonal, más preferiblemente del 20% superior de los linfocitos B de dicha población o línea de linfocito B
monoclonal, más preferiblemente del 15% superior de los linfocitos B de dicha población o línea de linfocito B
65 monoclonal, más preferiblemente del 10% superior de los linfocitos B de dicha población o la línea de linfocito B
monoclonal, más preferiblemente del 1% superior de los linfocitos B de dicha población o de línea de linfocitos B

monoclonal. En una realización, un linfocito B de alta afinidad se selecciona del 1% superior de los linfocitos B de una población o línea de linfocito B monoclonal con respecto a la capacidad de unión y/o afinidad.

La afinidad promedio para un antígeno de interés del anticuerpo producido mediante una población de linfocitos B, preferiblemente mediante una línea de linfocito B monoclonal, cultivada de al menos un linfocito B de alta afinidad de acuerdo con la invención es preferiblemente al menos 1.1 veces la afinidad promedio para dicho antígeno de interés de la población de linfocitos B de los cuales al menos se seleccionó un linfocito B de alta afinidad, más preferiblemente al menos 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 10.0, 20, 50, 100 veces, o más, la afinidad promedio por dicho antígeno de interés.

La afinidad de un anticuerpo se puede determinar utilizando cualquier método conocido por la persona experta en la técnica. La afinidad de un anticuerpo se determina por ejemplo utilizando un ensayo inmunsorbente ligado a enzima (ELISA), Resonancia de Plasmón Superficial (tal como Biacore) u Octet (ForteBio). La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) y el Octet son técnicas para medir las interacciones biomoleculares en tiempo real en un ambiente libre de marcador, para el SPR, una de las interacciones, por ejemplo un anticuerpo, se inmoviliza en la superficie del sensor, la otra, por ejemplo antígeno, está libre en la solución y pasa sobre la superficie. La asociación y disociación se mide en unidades arbitrarias y preferiblemente se despliega en un sensorgrama. Cualquier cambio en el número de moléculas unido a la punta del biosensor origina un cambio en el patrón de interferencia que se puede medir en tiempo real. Utilizando Octet se analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada de dos fuentes, una capa de proteína inmovilizada sobre la punta del biosensor, y una capa de referencia interna. La unión entre un ligando inmovilizado en la superficie de la punta del biosensor, por ejemplo un anticuerpo, y una proteína en solución, por ejemplo un antígeno de interés producen un incremento en el grosor óptico de la punta del biosensor, que da como resultado un cambio en la longitud de onda que es una medida directa del cambio en el grosor de la capa biológica. ELISA comprende inmovilizar una proteína, por ejemplo un antígeno de interés, sobre la superficie del soporte sólido, por ejemplo una placa de 96 pozos, y aplicar una muestra para ser detectada o cuantificada sobre el soporte sólido. Alternativamente, un anticuerpo de captura se fija sobre la superficie del soporte sólido después de lo cual una muestra que contiene la proteína a ser detectada o cuantificada se aplica al anticuerpo de captura inmovilizado permitiéndole a la proteína de interés unirse. Las proteínas que no se unen son lavadas. Posteriormente un anticuerpo específico conjugado a un marcador o una enzima (o un anticuerpo primario seguido por un anticuerpo secundario conjugado a un marcador o a una enzima) se agrega al soporte sólido. Preferiblemente, se determina la constante de afinidad (K_D) de un anticuerpo producido mediante un linfocito B de acuerdo con la invención

La unión de un linfocito B de acuerdo con la invención a un antígeno de interés se puede medir utilizando cualquier método conocido por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, un antígeno de interés se marca con, por ejemplo, una marca fluorescente. La detección de unión puede posteriormente determinarse mediante varias técnicas, entre las cuales la microscopía de fluorescencia y la selección de célula activada por fluorescencia (FACS). El FACS permite la separación de las células en una suspensión sobre la base del tamaño y la fluorescencia de los anticuerpos conjugados dirigidos contra los antígenos de superficie.

Seleccionar al menos un linfocito B de alta afinidad de una población de linfocitos B, preferiblemente de una línea de linfocito B monoclonal, se puede efectuar utilizando cualquier método conocido por una persona versada en la técnica. La selección de al menos un linfocito B de alta afinidad de acuerdo con la invención es por ejemplo efectuada al seleccionar la célula por ejemplo utilizando FACS (ver anteriormente) o dilución limitada. La dilución limitada comprende la disolución en serie de una suspensión de células, por ejemplo linfocitos B hasta que una célula única está presente en un volumen dado. Posteriormente la capacidad de unión de cada linfocito B (después de la expansión de células únicas a una población) se ensaya para permitir la selección de anticuerpos que producen linfocitos B con una alta afinidad por antígeno.

Un linfocito B capaz de producir anticuerpo se definió como un linfocito B cuyo linfocito B es capaz de producir y/o secretar anticuerpo o una parte funcional del mismo, y/o cuya célula es capaz de desarrollarse en una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpo o una parte funcional del mismo.

Una parte funcional de un anticuerpo se define como una parte que tiene al menos una misma propiedad que dicho anticuerpo en clase, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional es preferiblemente capaz de unirse a un mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma proporción. Una parte funcional de un anticuerpo preferiblemente comprende un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única, un fragmento FAB, un nanocuerpo, un unicuerpo, un fragmento variable de cadena única (scFv), o un fragmento $F(ab')_2$.

Ejemplos no limitantes de un linfocito B utilizado o seleccionado en un método de acuerdo con la invención incluye los linfocitos B derivados de un individuo humano, roedor, conejo, llama, cerdo, vaca, cabra, caballo, simio, chimpancé, macaco y gorila. Preferiblemente, dicho linfocito B es una célula humana, una célula de murino, una célula de conejo, una célula de simio, una célula de chimpancé, una célula de macaco y/o una célula de llama. Más preferiblemente, dicho linfocito B es un linfocito B humano.

En una realización preferida, un linfocito B de memoria se selecciona en la etapa a) del método como se describió aquí, por ejemplo un linfocito B de memoria humano. En una realización particularmente preferida, dicho linfocito B de

memoria es un linfocito B de memoria de sangre periférica. Los linfocitos B de memoria de sangre periférica son fácilmente obtenidos, sin mucha incomodidad para el individuo del que ellos son derivados y parecen ser muy adecuados para uso en un método de acuerdo con la presente invención.

5 Una célula B o una población de células B, preferiblemente una línea de linfocito B monoclonal, obtenida con un método de acuerdo con la invención es preferiblemente estable durante al menos cuatro semanas, más preferiblemente al menos seis semanas, más preferiblemente al menos nueve semanas, más preferiblemente durante al menos tres meses, más preferiblemente durante al menos seis meses, significando que tales linfocitos B son capaces tanto de replicarse como de producir anticuerpo, o capaces de replicarse y desarrollarse en una célula que produce anticuerpo, durante dichos periodos de tiempo. Los linfocitos B obtenidos por un método de acuerdo con la invención preferiblemente comprenden células que producen IgM o células que producen otros isotipos de inmunoglobulina como IgG, o IgA, o IgE, preferiblemente IgG. Un linfocito B obtenido por un método de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para uso en producir una línea celular que produce anticuerpos. Los linfocitos B de alta afinidad o una población o una línea de linfocito B monoclonal de linfocitos B de alta afinidad obtenida por un método de acuerdo con la invención son preferiblemente cultivados *ex vivo* y el anticuerpo es preferiblemente reconectado para uso adicional. Los anticuerpos o las partes funcionales del mismo producidos con un método de acuerdo con la invención son útiles para una amplia variedad de aplicaciones, tales como partes del mismo producidas con un método de acuerdo con la invención son útiles para una amplia variedad de aplicaciones tal como por ejemplo aplicaciones terapéuticas, profilácticas y de diagnóstico, así como también propósitos de investigación y experimentos *ex vivo*. Por ejemplo, se efectúa un ensayo de selección en donde los anticuerpos o las partes funcionales obtenidas por un método de acuerdo con la invención se incuban con una muestra con el fin de determinar si el antígeno de interés está presente.

En una realización, un linfocito B de alta afinidad o una población o línea de linfocito B monoclonal de linfocitos B de alta afinidad obtenidos por un método de acuerdo con la invención comprenden un linfocito B humano, capaz de producir anticuerpo humano, porque los anticuerpos humanos son particularmente adecuados para aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas en individuos humanos.

La expresión del BCL6 en un linfocito B es inducida, mejorada y/o mantenida de una variedad de maneras. En un método de acuerdo con la invención un linfocito B está provisto con un ácido nucleico que codifica BCL6.

En un método de acuerdo con la invención dichos linfocitos B son al menos en alguna etapa incubados con IL 21 y CD40L. Un linfocito B tal como un linfocito B similar a plasmablasto que produce anticuerpo, es preferiblemente cultivado en la presencia de CD40L ya que la replicación de la mayoría de los linfocitos B está favorecida por el CD40L. Se prefiere adicionalmente que el STAT 3 se active en dicho linfocito B. Más preferiblemente el IL 21 se utiliza para regular hacia arriba el STAT 3, ya que el IL 21 es particularmente adecuado por influenciar la estabilidad de un linfocito B de acuerdo con la invención. Además de la regulación hacia arriba del STAT3, el IL 21 es capaz de regular hacia arriba la expresión de Blimp1 aun cuando la expresión de Blimp 1 es contrarrestada por el BCL6.

En otra realización la cantidad del producto de expresión de Blimp-1 en dicho linfocito B seleccionado en la etapa a) de un método de acuerdo con la invención es directa o indirectamente controlado. La cantidad de producto de expresión del Blimp-1 se puede controlar de varias maneras por ejemplo al regular STAT3 o una parte funcional, derivado o análogo del mismo. El STAT3 es activado de una variedad de maneras. Preferiblemente, el STAT3 es activado al suministrar un linfocito B de acuerdo con la invención con una citosina. Las citosinas, que están naturalmente involucradas en la diferenciación del linfocito B, son muy efectivas para regular las proteínas STAT. Los activadores muy efectivos del STAT3 son IL-21 e IL-6, pero también IL-2, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-27 son conocidos por activar el STAT3. Más aún, los receptores tipo Toll (TLR) que están involucrados en inmunidad innata son también capaces de activar el STAT3. Más preferiblemente se utiliza el IL-21. El IL-21 es capaz de regular hacia arriba la expresión del Blimp-1 aun cuando la expresión del Blimp-1 es contrarrestada por el BCL6.

Por una parte funcional del STAT3 se significa una molécula proteínica que tiene la misma capacidad – en clase, no necesariamente en cantidad, de influenciar la estabilidad de una célula que produce anticuerpo comparada con el STAT3. Una parte funcional de una proteína esta desprovista por ejemplo de aminoácidos que no están, o están muy poco, involucrados en dicha capacidad. Un derivado de STAT3 se define como una proteína que ha sido alterada de tal manera que la capacidad de dicha proteína de influenciar la estabilidad de una célula que produce anticuerpo es esencialmente la misma en clase, no necesariamente en cantidad. Un derivado se suministra de muchas maneras, por ejemplo a través de una sustitución conservadora de aminoácido en donde un aminoácido se sustituye por otro aminoácido con generalmente propiedades similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de tal manera que es probable que el funcionamiento total no se afecte seriamente. Un derivado por ejemplo comprende una proteína de fusión cuya actividad depende de la presencia de 4 hidroxil- tamoxifen (4HT). Un análogo de STAT3 se define como una molécula que tiene la misma capacidad de influenciar la estabilidad de una célula que produce anticuerpo en clase, no necesariamente en cantidad. Dicho análogo es no necesariamente derivado de dicha proteína STAT3.

Un método de acuerdo con la invención es preferiblemente utilizado para generar una línea celular de linfocitos B de alta afinidad que es estable durante al menos una semana, preferiblemente al menos un mes, más preferiblemente al menos tres meses, más preferiblemente al menos seis meses de tal manera que la producción comercial de anticuerpo de alta afinidad se ha vuelto posible. Preferiblemente, se produce una línea celular estable capaz de producir anticuerpos

monoclonales de alta afinidad. Esto se efectúa preferiblemente al utilizar linfocitos B de memoria que han sido por ejemplo aislados de una muestra mediante la selección para CD19 (marcador de linfocito B y una superficie celular IgG y/o CD27 para marcar las células de memoria). Adicionalmente, un linfocito B de memoria capaz de unirse específicamente a un antígeno de interés es por ejemplo seleccionado en un ensayo de unión que utiliza dicho antígeno de interés. Posteriormente, el BCL6 y el Bcl -XL son coexpresados en dicho linfocito B, dando como resultado una población de células específicas para dicho antígeno de interés. Preferiblemente, solamente una célula de memoria se selecciona en la etapa a) de un método como se describió aquí, de tal manera que se obtiene una población de linfocito B de acuerdo con la invención que produce anticuerpos monoclonales (una línea de linfocito B monoclonal).

En una realización, un linfocito B, preferiblemente pero no necesariamente un linfocito B de memoria, que se origina de un individuo que ha sido previamente expuesto a un antígeno de interés, se utiliza en un método de acuerdo con la invención. Sin embargo, no es necesario. También es posible utilizar un linfocito B de un individuo que no ha sido expuesto a dicho antígeno de interés. Por ejemplo, un linfocito B se utiliza que sea específico para otro antígeno pero muestre reactividad cruzada con el antígeno de interés. Como otro ejemplo, se utiliza un linfocito B que se selecciona de una población de linfocito B primitivo de un individuo. La población de linfocito B primitivo de un individuo puede contener linfocitos B que muestran reactividad con un antígeno de interés aún a través del individuo que no se ha expuesto a dicho antígeno de interés. Tal linfocito B de una población de linfocito B primitivo es por ejemplo seleccionado utilizando antígeno marcado de interés.

La invención adicionalmente describe linfocitos B aislados o recombinantes y poblaciones de linfocitos B, preferiblemente líneas de linfocito B monoclonal, obtenidas mediante un método de acuerdo con la invención. Tales linfocitos B de alta afinidad son preferiblemente estables durante al menos una semana, preferiblemente durante al menos un mes, más preferiblemente durante al menos tres meses, más preferiblemente durante al menos seis meses, significando que el linfocito B es capaz tanto de replicarse como producir anticuerpo, o capaz de replicarse y desarrollarse en una célula que produce anticuerpo, durante dichos periodos de tiempo. Los linfocitos B obtenidos mediante un método de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente células que producen IgM o células que producen otros isotipos de inmunoglobulina como IgG, o Ig A, o IgE, preferiblemente IgG. Un linfocito B obtenido mediante un método de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para uso en producir una línea celular que produce anticuerpo. Los linfocitos B de alta afinidad obtenidos por un método de acuerdo con la invención son preferiblemente cultivados *ex vivo* y el anticuerpo es preferiblemente recolectado para uso adicional. Los anticuerpos obtenidos de un linfocito B o de una población de linfocitos B o una línea celular monoclonal obtenida por un método de acuerdo con la invención también se describen. Los anticuerpos de alta afinidad o las partes funcionales del mismo producidas con un método de acuerdo con la invención son útiles para una amplia variedad de aplicaciones, tal como por ejemplo aplicaciones terapéuticas, profilácticas, y de diagnóstico, así como también propósitos de investigación y experimentos *ex vivo*. Por ejemplo, se efectúa un ensayo de selección en donde los anticuerpos de las partes funcionales obtenidas por un método de acuerdo con la invención están incubados con una muestra con el fin de determinar si el antígeno de interés está presente.

Los linfocitos B generados con un método de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para producir anticuerpos de alta afinidad contra un antígeno de interés. En una realización preferida, sin embargo, los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de Ig se aíslan de dicha célula y se expresan en una segunda célula, tal como por ejemplo células de una línea celular de ovario de hámster Chino (CHO). Dicha segunda célula, también denominada aquí una célula productora, es preferiblemente adaptada a producción de anticuerpo comercial. La proliferación de dicha célula productora da como resultado una línea celular productora capaz de producir anticuerpo. Preferiblemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir compuestos para uso en humanos. De esta manera, dicha línea celular productora está preferiblemente libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos.

La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Leyendas de las figuras

Figure 1. (A) Unión de una proteína HA H3 marcada al BCR de las células específicas H3 dentro de una población de linfocito B policlonal. Los linfocitos B que se unen a la proteína H3 con alta afinidad fueron clonados mediante selección de célula única. Después de 2-3 semanas de cultivo el sobrenadante del cultivo fue tamizado para anticuerpos específicos H3. (B) Ejemplo de selección efectuada para seleccionar clones específicos. (Panel izquierdo) Seleccionado mediante ELISA. La proteína H3 recombinante fue recubierta sobre una placa seguida por incubación con sobrenadante de cultivo. La unión de anticuerpo se detectó utilizando IgG-HRP antihumano. (Panel derecho) la selección sobre superficie celular expresó HA. Las células infectadas con H3N2 fueron incubadas con sobrenadante de cultivo de linfocito B. La unión de antígeno se detectó con un F(ab')₂ antihumano de cabra marcado con PE.

Figura 2. (Izquierda) los niveles de mRNA de AICDA en linfocitos B GC CD19+CD38+CD20+IgD- tonsilar y los linfocitos B de memoria sanguínea periférica CD19+IgG +CD27 se compararon con 23 líneas celulares monoclonales transducidas BCL6- y Bcl-xL. (Derecha) Selección de subclones de alta o baja unión dentro de un clon específico H3. Las poblaciones en el cuadro fueron seleccionadas mediante selección de célula y expandidas adicionalmente.

Figura 3. A) El análisis FACS para la unión de HA H3 marcado para células seleccionadas 13 días después de su selección para unión de H3 BCR superior o inferior de una célula clonal. La unión H3 incrementada o disminuida es mantenida y es estable después de subclonación. B) El teñido del FACS para el BCR de las diferentes subpoblaciones seleccionadas. Los niveles crecientes o disminuidos de unión H3 para seleccionar poblaciones que se correlacionan con la expresión del BCR sobre la superficie celular de estas poblaciones. Línea gris clara: linfocitos B seleccionados para unión H3 alta; gráfica rellena: linfocitos B no seleccionados (células parentales); línea gris oscura: Linfocitos B seleccionados para unión H3 baja.

Figura 4. El ELISA H3 del cultivo de sobrenadante de las diferentes (sub) poblaciones. El IgG secretado de las células que fueron seleccionadas para unión superior a proteína H3-APC muestran unión incrementada en el H3 ELISA comparado con el IgG de la línea parental no seleccionada. Línea superior: Los linfocitos B seleccionados para unión H3 alta; línea media: linfocitos B no seleccionados (células parentales); línea inferior: linfocitos B seleccionados para unión H3 baja.

Figure 5. Selección para subclones de alta o baja afinidad dentro de un clon específico H3 (AT10_004). Las células fueron teñidas con antígeno HA H3 marcado con Alexa-647 junto con anticuerpo IgG-PE. Las poblaciones circuladas fueron seleccionadas mediante selección de célula y expandidas adicionalmente.

Figura 6. El Análisis FACS para la unión de HA H3 marcado con un teñido BCR (para la cadena pesada, IgG-PE, o para la cadena ligera, Kappa-PE) para células seleccionadas 2 semanas después de su tercera ronda de selección para unión H3 BCR mayor o inferior y AT10_004 parental.

Figura 7. La revisión de los cambios del aminoácido que fueron encontrados en las subpoblaciones seleccionadas con afinidad incrementada o disminuida. Las mutaciones en la secuencia del AT10_004 que estuvieron asociadas con unión de antígeno H3 incrementado se incorporaron en la secuencia de AT10_004 estos anticuerpos fueron producidos recombinantes en células 239T y purificados para análisis adicional (mutante B AT10_004 y mutante C AT10_004).

Figura 8. El análisis SPR de la unión de los anticuerpos AT10_004 a HA H3. Curvas de asociación de los anticuerpos AT10_004, AT10_004 mutante A, AT10_004 mutante B y AT10_004 mutante C.

Figure 9. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de las variantes de anticuerpo AT10_004 que se unen a células infectadas con H3N2 en ensayos FACS. Diferentes concentraciones de AT10_004, AT10_004 mutante B, AT10_004 mutante C y Rituximab (control negativo) recombinantes fueron incubadas con células infectadas con H3N2. La unión anticuerpo fue detectada con F(ab')₂ antihumano de cabra marcado con PE. La gráfica es la media y el SEM del MFI de la señal PE resultante.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de anticuerpo humano monoclonal específico (HA) H3 de hemaglutinina anti influenza

Las células B de memoria humana fueron inmortalizadas utilizando la tecnología BCL6 / Bcl-xL descrita por Kwakkenbos et al. (Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor- positive human memory B cells by genetic programming. Nature Medicine (2010) vol. 16 (1) pp. 123-8 y la solicitud de patente MEANS AND METHODS FOR INFLUENCING THE STABILITY OF ANTIBODY PRODUCING CELLS [WO 2007/067046]). En resumen, las células transducidas BCL6 y Bcl-xL (GFP positiva) fueron cultivadas con células L que expresan CD40 Ligando e interleucina (IL)-21 antes de que las células de unión HA H3 fueran seleccionadas utilizando seleccionador de célula activado por Fluorescencia (FACS) (Figure 1A). La proteína HA de influenza (Protein Cscience) fue marcada con Fluor Alexa 647 (Sondas Moleculares) y encubada con linfocitos B cultivados policlonales. Las células positivas HA fueron células únicas seleccionados por pozo y mantenidas en cultivo durante 2 a 3 semanas antes de que los clones fueran seleccionados por unión HA mediante 1) ELISA o 2) unión a células infectadas H3 (Figura 1B).

Ejemplo 2

Selección de un clon de linfocito B de afinidad mayor o inferior

Ya que los linfocitos B transducidos BCL6 Bcl-xL expresan la Desaminasa Inducida por Activación de Enzima (AID, nomenclatura de genes AICDA) como se describió por Kwakkenbos et al. (Figura 2 panel izquierdo y 'Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming' Nature Medicine (2010) vol. 16 (1) pp. 123-8) un linfocito B individual puede hacer cambios de nucleótido en la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina. Estos cambios pueden influenciar la afinidad de unión de los clones a su antígeno. Para determinar si los subclones del clon de unión HA H3 efectivamente pueden tener un perfil de unión diferente, el guion específico H3 fue de nuevo incubado con antígeno HA H3 marcado. Utilizando el FACS, una población de células de unión HA H3 bajas fueron seleccionadas (Figura 2, panel derecho) y mantenidas en cultivo durante al menos 13 días antes de que el sobrenadante de linfocito B fuera cosechado y ensayado.

Ejemplo 3

Las células B seleccionadas de alta y baja afinidad HA H3 expresan un nivel estable pero variable de inmunoglobulina superficial.

Primero caracterizamos la estabilidad de las células seleccionadas al analizar la capacidad de unión de receptor de linfocito B (BCR) a HA H3 marcado mediante FACS (Figura 3A). Ya que los linfocitos seleccionados altos HA H3 aun mostraron capacidades de unión mayores determinamos luego el nivel de expresión de inmunoglobulina superficial mediante FACS (Figura 3B). Se observó que las células seleccionadas por una capacidad de unión relativamente baja a HA H3 expresó menos proteína de inmunoglobulina sobre la superficie comparada con las células seleccionadas para unión HA alta. Esta expresión BCR superior o inferior y la unión BCR a proteína HA H3 se mantuvo durante el tiempo y llegó a ser más pronunciada después de la segunda ronda de selección (datos no mostrados)

Ejemplo 4

Afinidad por HA H3 de los anticuerpos derivados de las células de unión HA H3 originales y de alta y baja afinidad

Para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B que reconocen HA H3 el sobrenadante de los cultivos del día 13 de las células de unión HA H3 originales y las células de unión HA H3 de alta y baja afinidad se analizaron mediante ELISA. El HA H3 (1ug/ml, Protein Science) se recubrió directamente sobre la placa antes de que los pozos fueran incubados con los sobrenadantes de linfocito B diferentes. La unión a los IgG humanos y a la proteína HA H3 se efectuó con un anticuerpo de cabra policlonal antihumano que fue marcado con HRP. El IgG secretado de las células que fueron seleccionadas por mayor unión a la proteína H3- APCV mostró unión incrementada en el H3 ELISA comparado con el IgG de la línea parental no seleccionada. (Figura 4)

Ejemplo 5

BCR combinado – teñido de antígeno para selección de clones de alta y baja afinidad.

En el Ejemplo 2 y 3 se muestra que la selección de linfocitos B dentro de la subpoblación heterogénea de un clon de linfocito B monoclonal, con el nivel más alto de unión H3 se puede seleccionar para células que tienen niveles elevados de expresión BCR. Así cuando se hace la selección solamente con base en el nivel de unión H3, las células que tienen una afinidad de antígeno incrementada pero bajos niveles de expresión BCR se podrían excluir. Para excluir la influencia del nivel de expresión de inmunoglobulina sobre la selección de los genes de alta afinidad, un nuevo conjunto de rondas de selección se efectuó utilizando una combinación de teñido de antígeno (H3-Alexa- 647) y teñido BCR (Figura 5). El teñido BCR se efectuó con anticuerpos que se unen a la cadena pesada o ligera del BCR. El teñido H3 alto y el teñido BCR bajo indica alta afinidad de antígeno, mientras que el teñido H3 bajo y el teñido BCR alto indican baja afinidad de antígeno.

Un clon de linfocito B específico HA H3 (AT10_004) se cultivó durante 2-3 semanas para producir millones de células antes de que se efectuara el teñido del antígeno-BCR. Las células que mostraron desviar la afinidad de antígeno, tanto positiva como negativa fueron seleccionadas y clasificadas en un clasificador de células. Después de 3 rondas de seleccionar y crecer, se efectuó un análisis FACS sobre estas células para determinar las diferencias en la unión de antígeno. Las células que fueron seleccionadas tres veces por unión de antígeno creciente o decreciente mostraron un claro cambio en la unión de antígeno comparado con las células no seleccionadas (Figura 6). La Figura 6 demuestra que la unión H3 incrementada o disminuida se mantiene y es estable después de la selección. .

Ejemplo 6

Secuenciación del BCR de las células seleccionadas

Aislamos el ARN total con un mini kit RNeasy® (Qiagen) de cultivos de linfocito B mutante AT10_004 y AT10_004 seleccionados por alta o baja afinidad, cADN generado del ARN, el PCR efectuó y analizo la secuencia de la cadena pesada y la cadena ligera del BCR. Una mutación conduce a un cambio de un aminoácido en la posición 38 (CDR1) que resulta en el intercambio de la Glicina a una Alanina en la cadena pesada se encontró para las células que fueron seleccionadas por afinidad disminuida (posteriormente denominadas mutante A). Las mutaciones que condujeron a cambios en los aminoácidos en la cadena ligera (comparados con la secuencia AT10_004 parental) se encontraron para las células seleccionadas de afinidad incrementada. El análisis de secuencia mostró un cambio en el aminoácido 108 (CDR3) en la cadena ligera kappa de una Serina a una Tirosina (posteriormente denominada mutante B). Una mutación adicional en la posición 38 que conduce al remplazo de Tirosina a una Fenilalanina se encontró en algunas secuencias (en lo sucesivo denominadas mutante C) (Figura 7 y tabla 1). Para producir AT10_004 recombinantes y los mutantes B y C de afinidad creciente y mAb, clonamos las regiones variables pesada y ligera en marco con IgG1 humano y regiones constantes Kappa en un vector basado en pcDNA3.1 (Invitrogen) y células 293T transitoriamente transfectadas. Purificamos el mAb recombinante del sobrenadante del cultivo con un ÄKTA (GE healthcare).

Ejemplo 7

Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR)

5 El análisis SPR se efectuó sobre un Sistema de imagen IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies BV., Enschede, The Netherlands) como se describió (Lokate et al., 2007, J. Am. Chem. Soc. 129: 14013-140318). En resumen, un ciclo de análisis SPR consiste de una o más etapas de incubación, en la cual los analitos se hicieron fluir sobre un sensor recubierto seguido por una etapa de regeneración, en la cual se retira el analito unido del sensor. Se efectuaron múltiples ciclos en un experimento. Series de diluciones (concentración que varía de 0.30 a 10 µg/ml) de AT10_004 y de anticuerpo mutante AT10_004 en un regulador de acoplamiento (PBS + 0.03 % Tween 20 + 0.01 mg/ml BSA) se inmovilizaron durante 99 minutos en un chip SPR tipo gel con película de oro con IgG- específico de humano (Ssens, Enschede, The Netherlands) utilizando un dispositivo micromanchador de flujo continuo (Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, UT, USA). Después del manchado, el sensor fue juagado 3 veces con PBS + 0.03 % de Tween 20 (PBST).

10

15 Para bloquear cualquiera de los sitios no ocupados en el chip SPR recubierto con anti-IgG, el chip fue primero inyectado con un IgG humano no específico (rituximab, 10 µg/ml en PBST) e incubado durante 45 minutos, seguido por 100 minutos de incubación con PBST. Después de esta etapa de bloqueo, se hicieron dos ciclos de inyecciones de blanco, que consiste cada una de 45 minutos de inyección con un regulador de ensayo vacío, (1x PBST + 0.01 % BSA) seguido por 100 minutos de incubación con PBST. Luego, el sensor se inyectó con 1 µg/ml de proteína HA3 de influenza recombinante (de H3N2, Wyoming, 03/2003, Sino Biological inc., Beijing, P.R. China) en regulador de ensayo incubado durante 45 minutos. Posteriormente, el sensor se lavó con PBST y se incubó durante 100 minutos (para medir la disociación de complejo). Los datos obtenidos se analizaron utilizando un software Sprint (versión 1.6.8.0, IBIS Technologies BV., Enschede, The Netherlands). Las constantes de unión fueron ajustadas utilizando un software Scrubber2 (Biologic Software, Campbell, Australia). La Figura 8 muestra que el HA3 recombinante no se asocia con el mutante AT10_004. Una proporción de asociación creciente de HA3 para el mutante B y C de AT10_004 se ve comparada con el AT10_004 no mutado. Las constantes de unión obtenidas para AT10_004 y cada mutante se muestran en la Tabla 2.

20

25

Ejemplo 8

30 Unión de anticuerpo a células infectadas con virus

Para ensayar la capacidad de unión del AT10_004 y los mutantes AT10_004 a células infectadas con virus, efectuamos análisis FACS sobre células infectadas con H3N2 de influenza (A/Netherlands/177/2008). Las células MDCK-SIAT crecieron en un matraz de cultivo T175 a 80-100% de confluencia en el DMEM/FCS/PS/G418. La capa de células se lavó 2x con 10 ml de PBS después de lo cual se agregaron 15 ml de Optimem/PS/G418/Tripsina. Posteriormente, 0.5 ml de 100.000 virus de influenza TCID50 se agregaron al matraz y las células fueron cultivadas a 37°C. Después de 24- 48 hr las células fueron lavadas 2x con 10 ml de PBS y separadas del plástico utilizando Tripsina-EDTA. Las células fueron contadas y congeladas a -150°C hasta uso. Las células infectadas fueron descongeladas e incubadas con anticuerpos AT10_004 (mutantes) o Rituximab (como control negativo) en varias concentraciones durante 30 minutos a 4°C y luego lavadas 2x con 150 µl de PBS/2%FCS. La unión de anticuerpo fue detectada con IgG-PE antihumano (Southern Biotech) y analizadas sobre un Guava easyCyte 8HT, Millipore). Los mutantes B y C de AT10_004 incrementaron ambos la intensidad de tefido sobre las células infectadas H3N2 comparadas con el anticuerpo AT10_004 parental (Figura 9).

35

40

45

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los anticuerpos AT10-004 y AT10-004 mutantes A, B y C. En las secuencias mutantes, las mutaciones en comparación con el anticuerpo AT10-004 se indican en negrita y subrayadas

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
1	AT10_004	CDR1 de cadena pesada	RHGIS
2	AT10_004	CDR2 de cadena pesada	WISAYTGDTDYAQKFQG
3	AT10_004	CDR3 de cadena pesada	LRLQGEVVVPPSQSNWFDP
4	AT10_004	CDR1 de cadena ligera	RASQSVSRYLA
5	AT10_004	CDR2 de	DASNRAT

ES 2 626 671 T3

		cadena ligera	
6	AT10_004	CDR3 de cadena ligera	QQRSNWLK
7	AT10_004	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYTFTRHGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYTGDIDY A QKFQGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDAAVYYCARLRLQGEVVVPPSQSNWFDPWGQ GTLVTVSS
8	AT10_004	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLYPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLKITFGGCTRLEIKGTV
9	AT10_004	CDR1 de cadena pesada	agg cat ggt atc agc
10	AT10_004	CDR2 de cadena pesada	tgg atc agc gct tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg
11	AT10_004	CDR3 de cadena pesada	ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc
12	AT10_004	CDR1 de cadena ligera	agg gcc agt cag agt gtt agc agg tac tta gcc
13	AT10_004	CDR2 de cadena ligera	gat gca tcc aac agg gcc act

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
14	AT10_004	CDR3 de cadena ligera	cag cag cgt gac aac tgg ctt aag
15	AT10_004	Cadena pesada	cag gtt cag ctg gtg cag tet gga get gag gtg agg aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag get tcc ggt tac acg ttt acc agg cat ggt ate age tgg gtg ega cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga tgg ate age get tac act ggt gac aca gae tat gea cag aaa tte cag ggg ega gtc acc atg acc aca gat aca tcc acg aac aca gcc tac atg gaa ctg agg age ctg aga tet gac gac gcg gcc gta tat tac tgt gcg aga ctt egt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg tte gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
16	AT10_004	Cadena ligera	gaa att gtg ttg aca cag tet cca gcc acc ctg tet ttg tat cca ggg gaa aga gcc acc ctc tet tgc agg gcc agt cag agt gtt age agg tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag get ccc agg ctc ctc ate tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc ate cca gcc agg tte agt ggc agt ggg tet ggg aca gac ttc acc ctc acc ate age age cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt gac aac tgg ctt aag ate acc ttc ggc caa ggg aca ega ctg gaa att aaa gga act gtg
17	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR1	RHAIS
18	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR2	WISAYTGDIDYAQKFQG
19	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR3	LRLQGEVVVPPSQSNWFDP
20	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR1	RASQSVSRYLA
21	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR2	DASNRAT
22	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR3	QQRSNWLK
23	AT10_004	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYTFTRHGAISWVRQAPGQGLEWMGWISAYTGDIDY A QKFQGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDAAVYYCARLRLQGEVVVPPSQSNWFDPWGQ GTLVTVSS

ES 2 626 671 T3

	mutante A		
24	AT10_004 mutante A	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLYPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCOORSNWLKITFGQGTREIKGTV

ES 2 626 671 T3

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
25	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR1	agg cat gct atc agc
26	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR2	tgg atc agc gct tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg
27	AT10_004 mutante A	Cadena pesada CDR3	ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc
28	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR1	agg gcc agt cag agt gtt agc agg tac tta gcc
29	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR2	gat gca tcc aac agg gcc act
30	AT10_004 mutante A	Cadena ligera CDR3	cag cag cgt agc aac tgg ctt aag
31	AT10_004 mutante A	Cadena pesada	cag gtt cag ctg gtg cag tet gga get gag gtg agg aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag get tcc ggt tac aeg ttt acc agg cat ggt ate age tgg gtg ega cag gcc cct gga caa ggg ett gag tgg atg gga tgg ate age get tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg ega gtc acc atg acc aca gat aca tcc acg aac aca gcc tac atg gaa ctg agg age ctg aga tet gac gac geg gcc gta tat tac tgt geg aga ett cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
32	AT10_004 mutante A	Cadena ligera	gaa att gtg ttg aca cag tet cca gcc acc ctg tct ttg tat cca ggg gaa aga gcc acc ctc tct tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agg tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag get ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tet ggg aca gac ttc acc ctc acc atc agc age cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt age aac tgg ett aag atc acc ttc ggc caa ggg aca ega ctg gaa att aaa gga act gtg
33	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR1	RHGIS
34	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR2	WISAYTGDTDYAQKFQG
35	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR3	LRLQGEVVPPSQSNWFDP
36	AT10_004 mutante B	Cadena ligera CDR1	RASQSVSRILA

ES 2 626 671 T3

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
37	AT10_004 mutante B	Cadena ligera CDR2	DASNRAT
38	AT10_004 mutante B	CDR3 de cadena ligera	QQRYNWLK
39	AT10_004 mutante B	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYTFTRHGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYTGDY AQKFGGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDAVYYCARLRLQG EVVVPPSQSNWFDPWGQ GTLVTVSS
40	AT10_004 mutante B	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLYPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRYNWLKITFGQGTRLEIKGTV
41	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR1	agg cat ggt atc agc
42	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR2	tgg atc agc gct tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg
43	AT10_004 mutante B	Cadena pesada CDR3	ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc
44	AT10_004 mutante B	Cadena ligera CDR1	agg gcc agt cag agt gtt agc agg tac tta gcc
45	AT10_004 mutante B	Cadena ligera CDR2	gat gca tcc aac agg gcc act
46	AT10_004 mutante B	Cadena ligera CDR3	cag cag cgt tac aac tgg ctt aag
47	AT10_004 mutante B	Cadena pesada	cag gtt cag ctg gtg cag tet gga get gag gtg agg aag cct ggg gcc tea gtg aag gtc tcc tgc aag get tcc ggg tac acg ttt acc agg cat ggt atc agc tgg gtg ega cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga tgg ate age get tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg ega gtc acc atg acc aca gat aca tcc acg aac aca gcc tac atg gaa ctg agg agc ctg aga tet gac gac gcg gcc gta tat tac tgt gcg aga ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

ES 2 626 671 T3

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
48	AT10_004 mutante B	Cadena ligera	gaa att gtg ttg aca cag tet cca gcc acc ctg tet ttg tat oca ggg gaa aga gcc acc etc tet tgc agg gcc agt cag agt gtt age agg tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag get ecc agg etc etc ate tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc ate cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tet ggg aca gac ttc acc etc acc ate age age cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt tac aac tgg ett aag ate acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gaa att aaa gga act gtg
49	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR1	RHGIS
50	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR2	WISAYTGDTDYAQKFQG
51	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR3	LRLQGEVVVPPSQSNWFDP
52	AT10_004 mutante C	Cadena ligera CDR1	RASQSVSRFLA
53	AT10_004 mutante C	Cadena ligera CDR2	DASNRAT
54	AT10_004 mutante C	CDR3 de cadena ligera	QQRYNWLK
55	AT10_004 mutante C	Cadena pesada	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYTFTRHGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYTGDTDY AQKFGGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDAVYYCARLRLQGEVVVPPSQSNWFDPWGQ CTLVTVSS
56	AT10_004 mutante C	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLYPGERATLSCRASQSVSRFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFILTISSLEPEDFAVYYCQQRYNWLKITFGQCTRLEIKGTV
57	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR1	agg cat ggt atc agc
58	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR2	tgg atc agc gct tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg
59	AT10_004 mutante C	Cadena pesada CDR3	ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt caa tcc aat tgg ttc gac ccc
60	AT10_004 mutante C	Cadena ligera CDR1	agg gcc agt cag agt gtt agc agg ttc tta gcc

SEQ ID NO	Anticuerpo	Identidad	Secuencia
61	AT10_004 mutante C	Cadena ligera CDR2	gat gca tcc aac agg gcc act
62	AT10_004 mutante C	Cadena ligera CDR3	cag cag cgt tac aac tgg ctt aag
63	AT10_004 mutante C	Cadena pesada	cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg agg aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc ggt tac acg ttt acc agg cat ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga tgg atc agc gct tac act ggt gac aca gac tat gca cag aaa ttc cag ggg cga gtc acc atg acc aca gat aca tcc acg aac aca gcc tac atg gaa ctg agg agc ctg aga tct gac gac gcg gcc gta tat tac tgt gcg aga ctt cgt ttg cag ggt gaa gtg gtg gtc cct cct agt eaa tcc aat tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
64	AT10_004 mutante C	Cadena ligera	gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tat cca ggg gaa aga gcc acc ctc tet tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agg ttc tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg etc etc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc etc acc atc agc agc eta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt tac aac tgg ctt aag atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gaa att aaa gga act gtg

Tabla 2. Constantes de unión para AT10-004 y mutantes

Anticuerpo:	k_a :	k_d :	K_D :
AT10-004	1.4 (± 0.1)	0.1	70 (± 10)
AT10-004, mutante A	0	-	-
AT10-004, mutante B	1.9 (± 0.1)	0.1	50 (± 10)
AT10-004, mutante C	1.7 (± 0.1)	0.1	60 (± 10)

k_a en $10^4 \text{ seg}^{-1}\text{M}^{-1}$, k_d en 10^{-5} seg^{-1} , K_D en pM
 Las constantes se ajustan en Scrubber2, utilizando un ajuste a un modelo de interacción 1:1

Reivindicaciones

1. Un método para producir anticuerpos de alta afinidad específicos para un antígeno de interés que comprende:
- 5 a) Seleccionar un linfocito B capaz de producir anticuerpo específico para dicho antígeno de interés o seleccionar un linfocito B capaz de diferenciar en un linfocito B que es capaz de producir anticuerpo específico para dicho antígeno de interés;
- 10 b) Suministrar dicho linfocito B con una molécula de ácido nucleico que codifica BCL6;
- c) Suministrar dicho linfocito B con una molécula de ácido nucleico que codifica Bcl-xL;
- 15 d) Suministrar dicho linfocito B con IL21 y CD40L y permitir la expansión de dicho linfocito B en una población de dichos linfocitos B;
- e) seleccionar al menos un linfocito B de dicha población de linfocitos B que produce un receptor de linfocito B con una afinidad de unión mayor que la afinidad de unión promedio de dicha población de linfocitos B para dicho antígeno de interés;
- 20 f) permitir la expansión de dicho linfocito B en una población de dichos linfocitos B;
- g) seleccionar al menos un linfocito B de dicha población de linfocitos B que produce anticuerpo con una afinidad de unión superior que la afinidad de unión promedio de los anticuerpos producidos por dicha población de linfocitos B para dicho antígeno de interés;
- 25 h) cultivar dicho al menos un linfocito B en una población de linfocitos B; y
- i) obtener anticuerpos producidos mediante el cultivo de linfocitos B.
- 30 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho al menos un linfocito B es cultivado durante al menos cuatro semanas
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho linfocito B seleccionado en la etapa a) es un linfocito B de memoria.
- 35 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho linfocito B seleccionado en la etapa a) es un linfocito B de memoria humana.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además suministrar dicho linfocito B con un factor de crecimiento.
- 40 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho linfocito B es seleccionado en la etapa a) se origina de un individuo que ha sido previamente expuesto a dicho antígeno de interés.
- 45 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además expresar el gen derivado de dicho al menos un linfocito B que codifica la cadena pesada Ig y/o la cadena ligera Ig en una segunda célula.

Figura 1

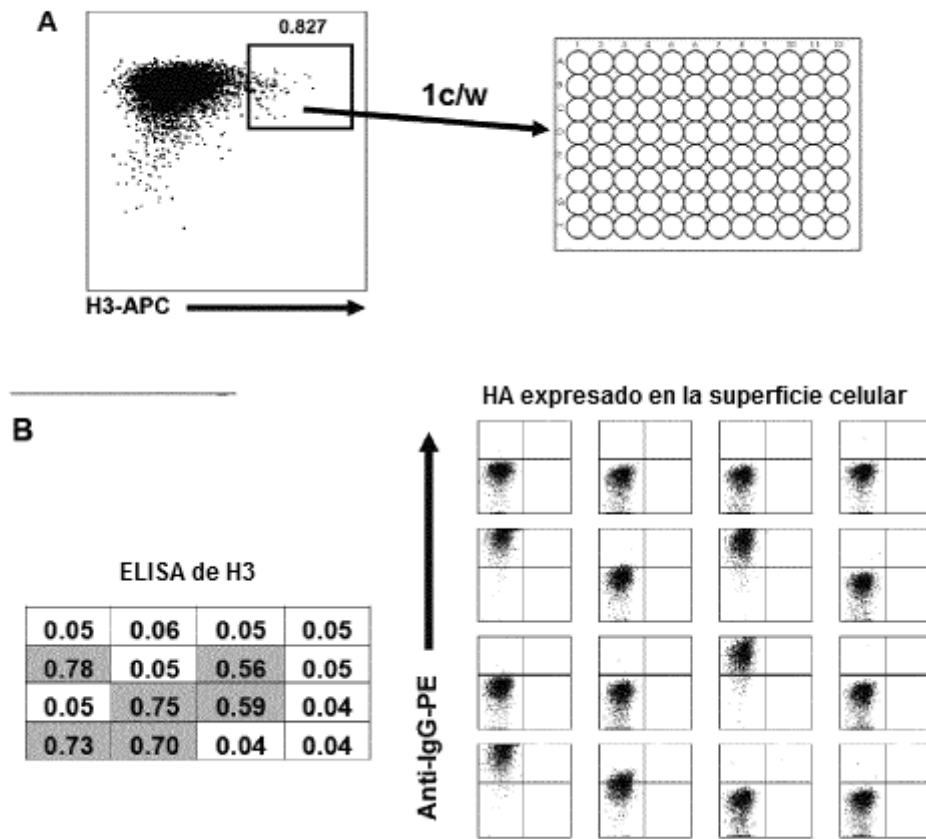


Figura 2

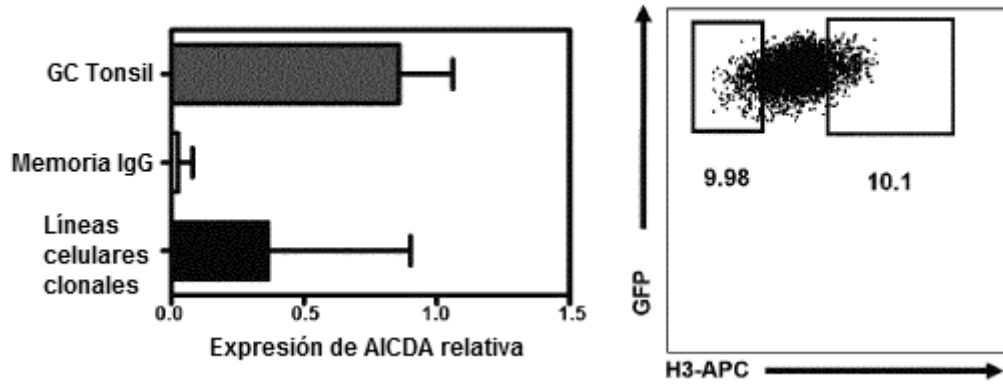
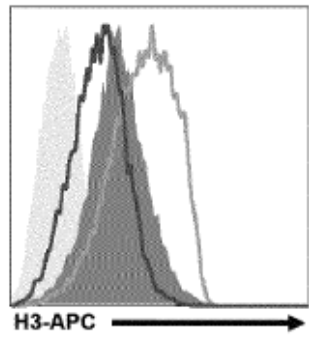


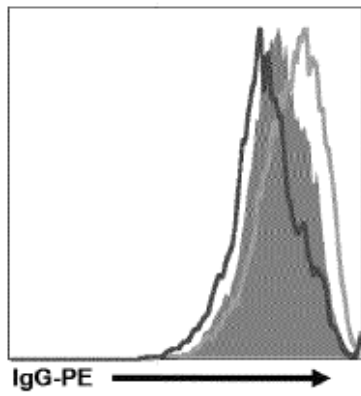
Figura 3

A



- Linfocitos B seleccionados para unión H3 alta
- Linfocitos B seleccionados para unión H3 baja
- Linfocitos B no seleccionados (células parentales)

B



- Linfocitos B seleccionados para unión H3 alta
- Linfocitos B seleccionados para unión H3 baja
- Linfocitos B no seleccionados (células parentales)

Figura 4

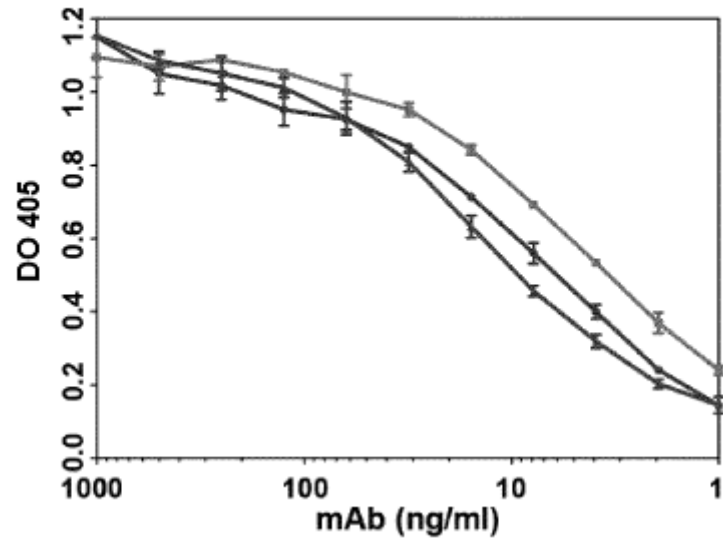


Figura 5

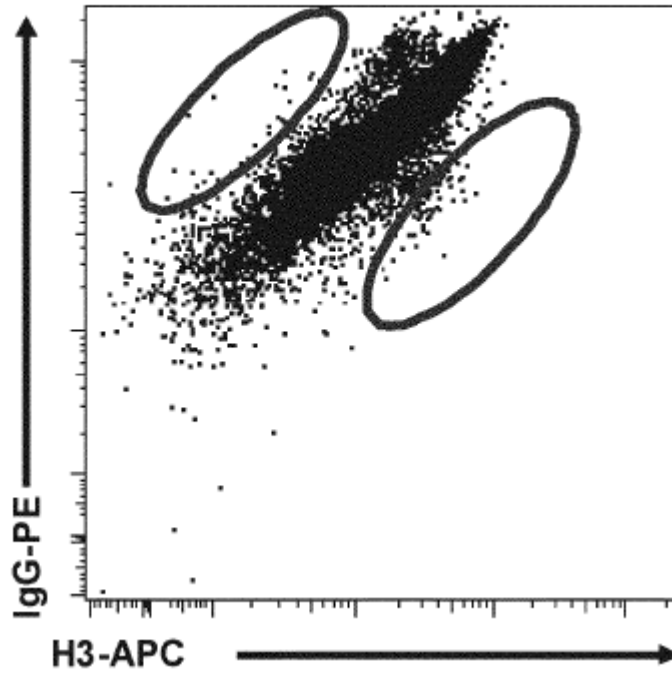


Figura 6

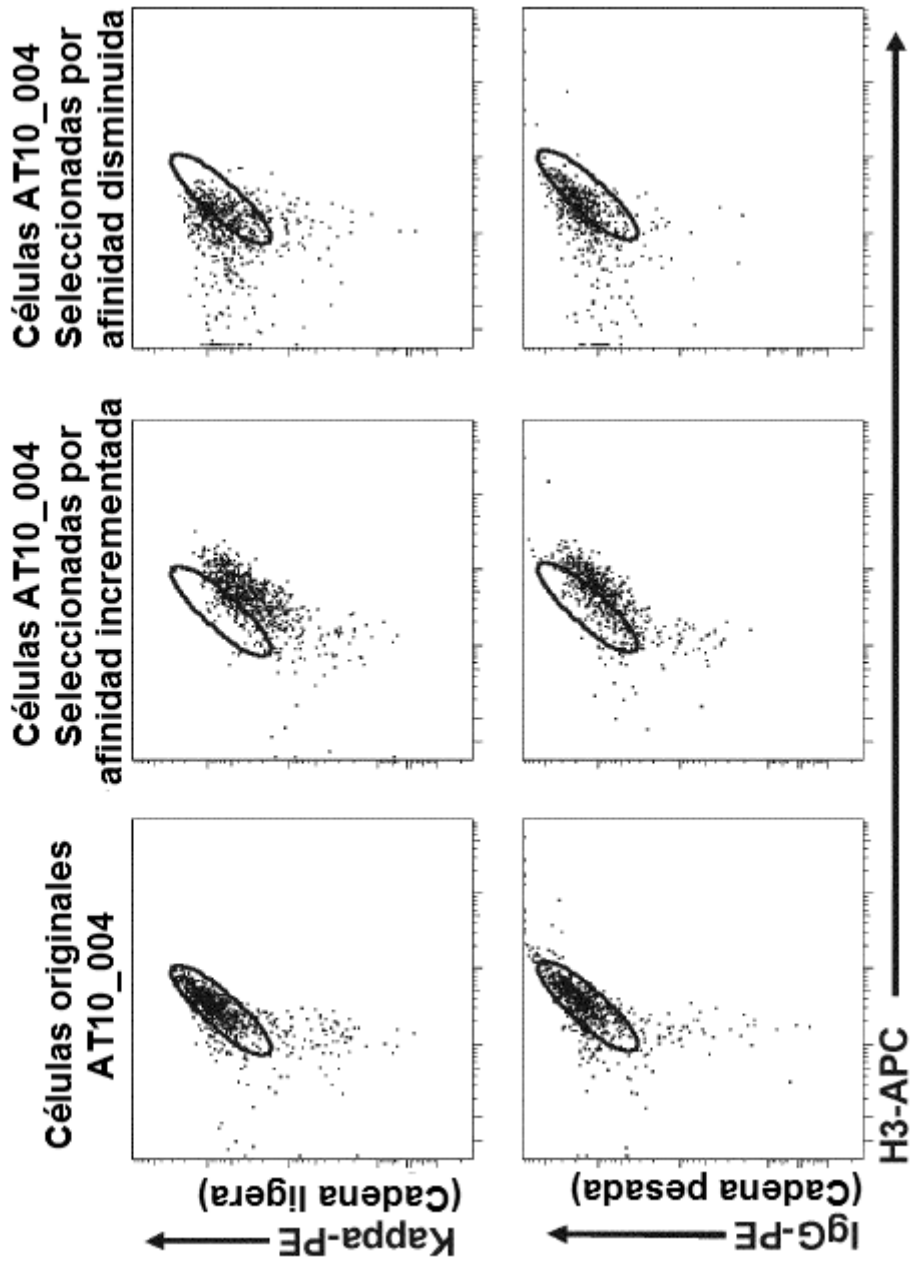


Figura 7

		Cadena ligera Kappa, CDR3 Posición 108	Cadena ligera Kappa, CDR1 Posición 38	Cadena pesada, CDR1 posición 38
Células parentales	AT10_004	S	Y	G
Células de afinidad disminuida	AT10_004 mutante A	S	Y	A
Células de afinidad incrementada	AT10_004 mutante B	Y	Y	G
Células de afinidad incrementada	AT10_004 mutante C	Y	F	G

Figura 8

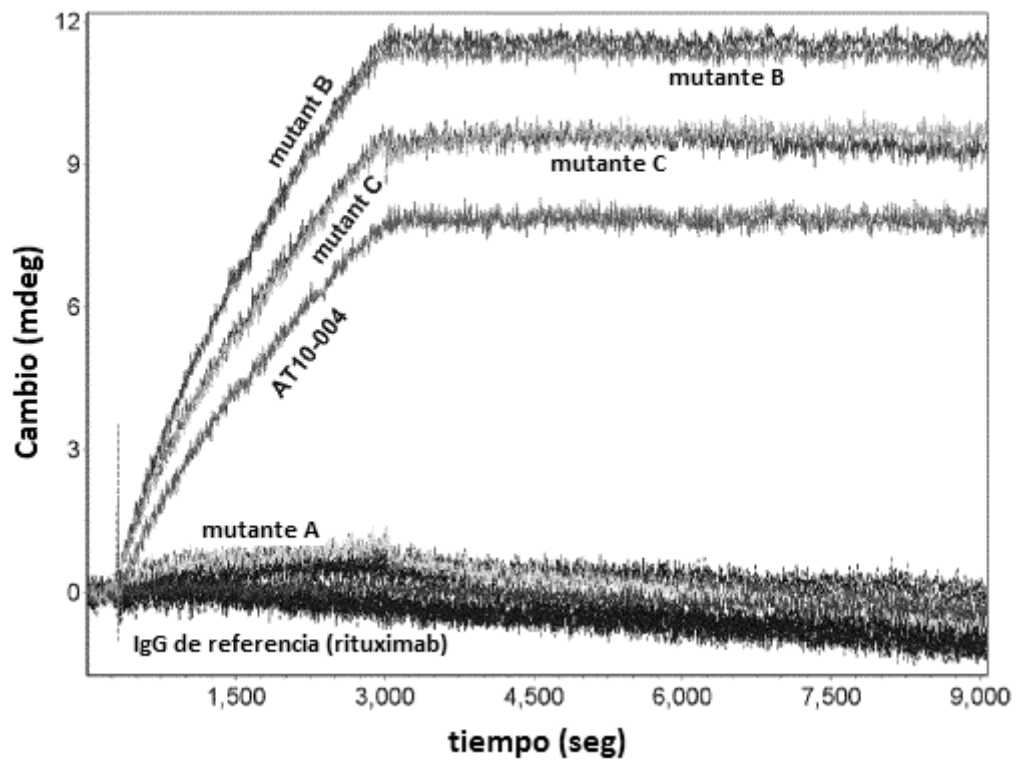


Figura 9

