

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 928**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2011 PCT/EP2011/058616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11722402 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2577304**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de linfocitos B simples**

30 Prioridad:

**28.05.2010 EP 10005602**

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

**18.09.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ENDL, JOSEF;  
SCHUHMACHER, NATALIE;  
OFFNER, SONJA;  
PLATZER, JOSEF;  
SIEWE, BASILE y  
THOREY, IRMGARD**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 632 928 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cultivo de linfocitos B simples

5 En esta invención se describe un procedimiento para la obtención de la secuencia de aminoácidos de al menos los dominios variables de un anticuerpo monoclonal segregado por un linfocito B simple que se ha obtenido a partir de una población de linfocitos B de un animal de laboratorio por depósito de células simples y cocultivo con células alimentadoras en presencia una mezcla alimentadora.

10 **Antecedentes de la invención**

Para la obtención de células que segreguen anticuerpos monoclonales se usa ampliamente la tecnología de hidridoma desarrollada por Koehler y Milstein. Sin embargo, en la tecnología del hibridoma solo una fracción de los linfocitos B obtenidos de un animal de laboratorio inmunizado se puede fusionar y propagar. La fuente de linfocitos B es, en general, un órgano de un animal de laboratorio inmunizado tal como el bazo.

Zubler et al. comenzaron a desarrollar en 1984 un método diferente para la obtención de células que segreguen anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo Eur. J. Immunol. 14 (1984) 357-63, J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183). En este documento los linfocitos B se obtienen a partir de la sangre del animal de laboratorio inmunizado y se cocultivan con células alimentadoras EL-4 B5 de ratón en presencia de una citocina que comprende mezcla alimentadora. Con esta metodología se pueden obtener hasta 50 ng/ml de anticuerpos después de 10-12 días de cocultivo.

Weitkamp, J-H., et al, (J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237) describen la generación de anticuerpos monoclonales humanos recombinantes contra rotavirus a partir de linfocitos B específicos del antígeno simples seleccionadas con partículas similares a virus fluorescente. Se informa de un procedimiento de producción de una pluralidad de anticuerpos aislados contra una pluralidad de antígenos conocidos en el documento US 2006/0051348. En los documentos WO 2008/144763 y WO 2008/045140 se informa de anticuerpos contra IL-6 y usos de los mismos y un procedimiento de cultivo para la obtención una población clonal de linfocitos B específicos del antígeno, respectivamente. En el documento US 2007/0269868 se informa de un procedimiento de cultivo para la obtención de una población clonal de linfocitos B específicos del antígeno. Masri et al. (en Mol. Immunol. 44 (2007) 2101-2106) informan de la clonación y expresión en *E. coli* de un fragmento Fab funcional obtenido de linfocito humano simple frente a toxina de carbunco. En el documento WO 2007/031550 se informa de un procedimiento de preparación de colecciones de inmunoglobulina.

En el documento WO 91/16418 se informa de un procedimiento de producción de una capa de células alimentadoras que soporta y estimula de forma eficiente el crecimiento de células implicadas en la producción de anticuerpos monoclonales, con lo que se transforma una línea celular primaria mediante el uso de un vector vírico que contiene oncogenes, de manera que la línea celular transformada produce uno o más factores de crecimiento usados por linfocitos B e hibridomas de linfocitos B. De la interleucina 1 que puede actuar como un factor de crecimiento y diferenciación de linfocito B informan Pike, B.L., et. al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 8153-8157). Lagerkvist, A.C., et al. (BioTechniques 18 (1995) 862-869) informaron de que se pueden usar linfocitos B específicos del antígeno simples para generar fragmentos Fab que usan amplificación mediada por CD40 o clonación por PCR directa.

Patel, K.D., et al. (Clin. Immunol. 133 (2009) 251-256) informaron de que la detección de citocinas de alta sensibilidad en el síndrome coronario agudo revela la sobreexpresión de interferón gamma e interleucina-10 tras un infarto de miocardio.

50 **Resumen de la invención**

En el presente documento se divulga un procedimiento para el aislamiento de un linfocito B de una población de linfocitos B que presenta propiedades especiales. En primer lugar, ya en un plazo de cuatro semanas después de la primera inmunización de un animal de laboratorio las células que producen anticuerpos inducidos se pueden aislar y se puede determinar la especificidad de unión de los anticuerpos. En segundo lugar, es posible mejorar el número y/o la calidad (por ejemplo, la capacidad de producción/secreción de anticuerpos) de células productoras de anticuerpos mediante una cualquiera de las siguientes etapas: i) una etapa de preincubación, y/o ii) una etapa de centrifugación, y/o iii) una etapa de adsorción. En tercer lugar, la mezcla alimentadora usada para el cocultivo de linfocitos B y células alimentadoras se puede mejorar con la adición de IL-21, o IL-6, o SAC, o BAFF.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la selección de un linfocito B que comprende las siguientes etapas:

- 65 a) opcionalmente marcar linfocitos B de una población de linfocitos B,  
b) cocultivar individualmente cada linfocito B de una población de linfocitos B, que se han depositado como célula simple, con células EL4-B5 murinas como células alimentadoras,

c) seleccionar un clon de linfocitos B que haga proliferar y segregue anticuerpo en la etapa b), en la que el cocultivo es en presencia de una mezcla alimentadora sintética que comprende IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.

5 En el presente documento se describe un procedimiento para obtener un clon de linfocitos B que comprende las siguientes etapas:

a) obtener linfocitos B de un animal de laboratorio,

b) marcar linfocitos B,

10 c) depositar los linfocitos B marcados como células simples,

d) cocultivar individualmente linfocitos B depositados en células simples con células alimentadoras,

e) seleccionar un clon de linfocitos B que haga proliferar y segregue anticuerpo en la etapa d) y obteniéndose de este modo un clon de linfocitos B.

15 En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno diana que comprende las siguientes etapas

a) opcionalmente marcar las células en una población de linfocitos B con al menos un colorante fluorescente,

20 b) cocultivar cada linfocito B de una población de linfocitos B, que se ha depositado como célula simple en recipientes individuales, en presencia de células EL4-B5 murinas como células alimentadoras e IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4, e IL-6 como mezcla alimentadora, para obtener clones de linfocitos B individuales y sobrenadantes de cultivo,

25 c) seleccionar un clon de linfocitos B que produzca un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana,

c1) determinar la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo mediante PCR con transcriptasa inversa,

30 c2) transfectar una célula con un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo,

d) cultivar una célula, que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo que se une específicamente al antígeno diana, que se produce mediante el clon de linfocitos B seleccionado en la etapa c), o una variante humanizada del mismo, y recuperar el anticuerpo del sobrenadante celular o de cultivo y con ello producir el anticuerpo.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para la producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

40 a) proporcionar una población de linfocitos B (maduros) (obtenidas de sangre de un animal de laboratorio),

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

45 c) depositar células simples de la población marcada de linfocitos B en recipientes individuales (en un modo de realización el recipiente es un pocillo de una placa multipocillo),

50 d) cultivar los linfocitos B individuales depositados en presencia de células alimentadoras y una mezcla alimentadora (en un modo de realización las células alimentadoras son células EL-4 B5, en un modo de realización la mezcla alimentadora es TSN natural, en un modo de realización la mezcla alimentadora es una mezcla alimentadora sintética),

55 e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos segregados en el medio de cultivo de los linfocitos B individuales,

f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera y pesada de anticuerpos que se unen de forma específica mediante PCR con transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y, de este modo, obtener un dominio variable de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico,

60 g) introducir el dominio variable de la 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,

65 i) cultivar la célula y recuperar el anticuerpo del sobrenadante de células o de cultivo celular y, de este modo,

producir un anticuerpo.

5 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el procedimiento comprende la etapa de incubar la población de linfocitos B en el medio de cocultivo antes del depósito de células simples. En un modo de realización la incubación es aproximadamente a 37 °C. En un modo de realización la incubación es durante 0,5 a dos horas. En un modo de realización específico la incubación es durante aproximadamente una hora. En un modo de realización la incubación es aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente una hora.

10 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el procedimiento comprende la etapa de centrifugar los linfocitos B depositados en células simples antes del cocultivo. En un modo de realización la centrifugación es durante aproximadamente de 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. En un modo de realización específico la centrifugación es durante aproximadamente 5 minutos. En un modo de realización la centrifugación es de aproximadamente 100 × g a aproximadamente 1000 × g. En un modo de realización específico la centrifugación es de aproximadamente 300 × g. En un modo de realización la centrifugación es durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 300 × g.

20 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el procedimiento comprende inmediatamente antes de la etapa de marcado la siguiente etapa: adsorción de los linfocitos B con antígeno inmovilizado.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento la población de linfocitos B se obtiene de sangre de un animal mediante una centrifugación por gradiente de densidad.

25 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento la población de linfocitos B se obtiene de sangre de un animal de laboratorio después de 4 días de la inmunización. En otro modo de realización la población de linfocitos B se obtiene de sangre de un animal de laboratorio de 4 días a al menos 9 días después de la inmunización. En un modo de realización adicional la población de linfocitos B se obtiene de sangre de un animal de laboratorio de 4 días a 9 días después de la inmunización

30 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento la población de linfocitos B se aísla mediante centrifugación por gradiente de densidad.

35 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B son linfocitos B maduros.

40 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el marcado es con uno a tres colorantes fluorescentes. En un modo de realización específico el marcado es con dos o tres colorantes fluorescentes.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el marcado de los linfocitos B da lugar al marcado de un 0,1 % a un 2,5 % de las células de la población total de linfocitos B.

45 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B son linfocitos B de ratón, o linfocitos B de hámster o linfocitos B de conejo.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el depósito de células simples se produce en los pocillos de una placa multipocillo.

50 Las células alimentadoras son células EL-4 B5 murina.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

55 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el marcado es de linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD268<sup>+</sup>, linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>, linfocitos B CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> o linfocitos B CD3<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>.

60 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B son de origen de ratón y el marcado es de linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, y/o linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B son de origen de hámster y el marcado es de linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>.

65 En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B son de origen de conejo y el marcado es de linfocitos B IgG<sup>+</sup> y/o linfocitos B CD138<sup>+</sup>, o linfocitos B CD138<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> y/o

linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>.

En un modo de realización de todos los aspectos de los que se informa en el presente documento el cocultivo es en un medio RPML1640 suplementado con FCS al 10 % (v/v), un 1 % (p/v) de una solución de glutamina 200 mM que comprende penicilina y estreptomina, un 2 % (v/v) de una solución de piruvato de sodio 100 mM y un 1 % (v/v) de un tampón de ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazin)-etanosulfónico 1 M (HEPES). En otro modo de realización el medio de cocultivo comprende además beta-mercaptoetanol 0,05 mM.

El cocultivo de los linfocitos B es con células alimentadoras y una mezcla alimentadora.

En un modo de realización específico la mezcla alimentadora es una mezcla alimentadora sintética. En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende interleucina-1 beta y factor de necrosis tumoral alfa. En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-10 (IL-10). En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende además células Cowans de cepas de *Staphylococcus aureus* (SAC). En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende interleucina-21 (IL-21). En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende factor de activación de linfocitos B de la familia del factor de necrosis tumoral (BAFF). En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende interleucina-6 (IL-6). En un modo de realización la mezcla alimentadora sintética comprende interleucina-4 (IL-4).

El procedimiento de obtención de un clon de linfocitos B puede comprender además la etapa de

f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera y pesada del anticuerpo producido por el clon de linfocitos B seleccionado de la etapa e) mediante una PCR con transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y, de este modo, obtener una secuencia del dominio variable de aminoácidos del anticuerpo monoclonal.

En un modo de realización el animal de laboratorio se selecciona de ratón, hámster y conejo.

### **Descripción detallada de la invención**

El procedimiento del que se informa en el presente documento permite una caracterización rápida de la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales obtenidos de clones de linfocitos B individuales, es decir, en las cuatro semanas después de la primera inmunización del animal de laboratorio las células que producen anticuerpo inducido se pueden aislar y se puede determinar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos a partir de las mismas, con lo que se puede llevar a cabo al menos 4 experimentos diferentes debido a la cantidad/concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cocultivo de los linfocitos B.

#### **Inmunización:**

A menudo se usan animales no humanos, tales como ratones, conejos, hámsters y ratas, como modelo animal para la evaluación de tratamientos basadas en anticuerpos. Por tanto, a menudo se requiere proporcionar anticuerpos con reactividad cruzada que se unan al antígeno de animal no humano así como al antígeno humano. El procedimiento del que se informa en el presente documento se puede usar para proporcionar anticuerpos con reactividad cruzada. En el procedimiento del que se informa en el presente documento se pueden usar linfocitos B obtenidos, por ejemplo, de ratón, hámster y conejo. En un modo de realización el ratón es un ratón NMRI o un ratón Balb/c. En otro modo de realización el hámster se selecciona de hámster armenio (*Cricetulus migratorius*), hámster chino (*Cricetulus griseus*) y hámster siro (*Mesocricetulus auratus*). En un modo de realización específico el hámster es el hámster armenio. En un modo de realización el conejo se selecciona de conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW), conejos Zimmermann (ZIKA), conejos de la familia mutante Alicia, conejos de la familia mutante basilea, conejos transgénicos con un locus de inmunoglobulina humana, conejos con desactivación de *rbgM* y cruces de los mismos.

En un modo de realización los animales de laboratorio, por ejemplo, ratones, hámsters y conejos, seleccionados para inmunización no son mayores de 12 semanas.

#### **Fuente y aislamiento de linfocitos B:**

La sangre de un animal de laboratorio proporciona una gran diversidad de linfocitos B que producen anticuerpos. Los anticuerpos segregados por linfocitos B obtenidos de la misma que apenas tienen secuencias de aminoácidos idénticas o solapadas dentro de las CDR, muestran, por tanto, una gran diversidad.

En un modo de realización los linfocitos B de un animal de laboratorio, por ejemplo, de sangre, se obtienen desde los 4 días después de la inmunización hasta al menos 9 días después de la inmunización o la inmunización de refuerzo más reciente. Este intervalo de tiempo permite una gran flexibilidad en el procedimiento del que se informa en el presente documento. En este intervalo de tiempo es probable que los linfocitos B proporcionen la migración de los anticuerpos más afines desde el bazo a la sangre (véase, por ejemplo, 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).

5 Los linfocitos B de sangre de un animal de laboratorio se pueden obtener con cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede usar la centrifugación con gradiente de densidad (DGC) o lisis de eritrocitos (lisis). La centrifugación por gradiente de densidad en comparación con la lisis hipotónica proporciona un mayor rendimiento global, es decir, número de clones de linfocitos B. Además de las células obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad, un gran número de células se divide y crece en la etapa de cocultivo. También es mayor la concentración de anticuerpo segregado en comparación con las células obtenidas con un procedimiento diferente. Por lo tanto, en un modo de realización proporcionar una población de linfocitos B es mediante centrifugación por gradiente de densidad.

**Tabla 1:** Número de pocillos productores de IgG/clones de células cuando se obtienen células por centrifugación por gradiente de densidad (DGC) o lisis hipotónica o de eritrocitos.

	ratón, DGC	ratón, lisis	ratón, DGC	ratón, lisis
número de células aisladas [ $\times 10^6$ ]	1,7 $\pm$ 0,2 (n = 2)	1,6 $\pm$ 0,1 (n = 2)	2,1 $\pm$ 0,2 (n = 2)	0,9 $\pm$ 0,1 (n = 2)
Pocillos de IgG <sup>+</sup> [%]	22	12	7	6

15

**Etapas de selección antes del cocultivo:**

20 Se pueden enriquecer que producen anticuerpos productores de linfocitos B que se unen específicamente a un antígeno a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la población de linfocitos B se enriquece a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

25 El término «que se une específicamente» y equivalentes gramaticales del mismo indica 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 de  $10^{-8}$  M a  $10^{-13}$  M, en un modo de realización adicional de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  M. El término se usa además para indicar que el anticuerpo no se une de forma específica 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 realización de  $10^{-6}$  M a 1 M.

30 En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento las PBMC son deficitarias en macrófagos. Esto es ventajoso como se ha indicado anteriormente, por ejemplo, como en un modo de realización para linfocitos B de origen de conejo, para la etapa de cocultivo.

35 Se pueden reducir los macrófagos en PBMC mediante adhesión a la superficie de la placa de cultivo celular (véase la etapa de preincubación).

En un modo de realización de los procedimientos de los que se informa en el presente documento las células son de un animal inmunizado con proteínas y se han reducido los macrófagos antes del marcado.

40 Se ha encontrado que incubar la población de linfocitos B en medio de cocultivo antes del depósito de células simples aumenta el número total de células que segregan anticuerpo obtenidas después del depósito de células simples en comparación con un depósito de células simples inmediatamente después del aislamiento y enriquecimiento opcional de la población de linfocitos B de la sangre de un animal de laboratorio (ejemplo conejo, véanse las tablas 2a y 2b). Específicamente, la incubación es a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente una hora en medio EL-4 B5, por ejemplo usando una estufa de incubación de cultivo celular.

45

**Tabla 2a:** Pocillos positivos para IgG/clones de células con y sin incubación durante una hora en medio EL-4 B5 antes del depósito en células simples de todas las células (rb = conejo)

ELISA de rblgG	PBMC frescas (células de Ø 100-20)	PBL tras incubación* (células de Ø 50-10)
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	40	108
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	28	75

\* con reducción de macrófagos y monocitos

**Tabla 2b:** Pocillos positivos para IgG/clones de células con y sin incubación durante una hora en medio EL-4 B5 antes del depósito en células simples de linfocitos B.

<b>ELISA de rblgG</b>	<b>Linfocitos B simples de PBMC frescas</b>	<b>Linfocitos simples de sangre, incubados 1 h</b>	<b>Linfocitos B simples de células del bazo frescas</b>	<b>Linfocitos B simples de bazo, incubados 1 h</b>
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	2	55	6	52
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	2	33	7	31

5 En un modo de realización de los procedimientos de los que se informa en el presente documento las células se obtienen de un animal inmunizado con proteínas y deficitario en macrófagos.

10 Se pueden reducir o enriquecer células que no producen un anticuerpo que se una al antígeno o, igualmente, células que producen un anticuerpo que se une al antígeno, respectivamente, mediante un método de adsorción. En el mismo, se presenta un ligando unido a una superficie y las células que se unen a la misma se enriquecen selectivamente en la población de células en caso de que las células unidas sean tratadas adicionalmente, o se reducen en la población de células en caso de que las células que permanecen en solución sean tratadas adicionalmente.

15 **Tabla 3:** Enriquecimiento de linfocitos B que segreguen un anticuerpo específico del antígeno mediante adsorción con el antígeno respectivo.

<b>Antígeno de proteína</b>	<b>sin adsorción</b>	<b>sin adsorción usando el antígeno</b>
Pocillos totales [n]	4284	2113
Pocillos IgG <sup>+</sup> específica para el antígeno [n]	235	419
Pocillos IgG <sup>+</sup> específica para el antígeno [% total de pocillos]	5	20
<b>antígeno de molécula pequeña</b>	<b>sin adsorción</b>	<b>sin adsorción usando la molécula pequeña</b>
Pocillos totales [n]	336	336
Pocillos IgG <sup>+</sup> de molécula pequeña [n]	2	115
Pocillos IgG <sup>+</sup> de molécula pequeña [% total de pocillos]	1	34

20 El procedimiento del que se informa en el presente documento comprende en un modo de realización antes del depósito de células simples una etapa de selección en la que linfocitos B que producen anticuerpos específicos y/o con reactividad cruzada se seleccionan en función de marcadores de superficie celular y separación/selección de células activadas por fluorescencia. En un modo de realización se separan/enriquecen/seleccionan linfocitos B maduros. Para la selección de linfocitos B de diferentes especies animales de laboratorio se pueden usar diferentes  
25 marcadores de superficie celular. Se ha encontrado que muchos de los marcadores de superficie celular disponibles, bien individualmente o en combinación, no proporcionan un marcado adecuado.

30 Con el marcado de poblaciones celulares no diana y linfocitos de unión no específica es posible reducir selectivamente estas células. En esta etapa de reducción solo se puede conseguir una reducción no total. Aunque la reducción no es cuantitativa proporciona una ventaja en el transcurso del marcado por fluorescencia de las células restantes, ya que el número de células de interferencia se puede reducir o incluso minimizar. Mediante el depósito en células simples de linfocitos B maduros (linfocitos B de memoria, plasmoblastos madurados por afinidad y células plasmocitos) por separación de células activadas con fluorescencia usando el marcado como se ha descrito anteriormente se puede obtener un número mayor de pocillos IgG<sup>+</sup>/células de clones en la etapa de cocultivo.

35 El término «marcado» denota la presencia o ausencia de un marcador de superficie que se puede determinar por la adición de un anticuerpo marcador antisuperficie marcado y de unión específica. Por tanto, la presencia de un marcador de superficie se determina, por ejemplo, en el caso de un marcador de fluorescencia con la aparición de fluorescencia, mientras que la ausencia de un marcador de superficie se determina por la ausencia de fluorescencia  
40 después de la incubación con el respectivo anticuerpo marcador antisuperficie marcado y de unión específica.

Se pueden marcar diferentes poblaciones celulares usando diferentes marcadores de superficie tales como células CD3<sup>+</sup> (linfocitos T), células CD19<sup>+</sup> (linfocitos B), células IgM<sup>+</sup> (linfocitos B maduros indiferenciados), células IgG<sup>+</sup> (linfocitos B maduros), células CD38<sup>+</sup> (por ejemplo, plasmoblastos) y células IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (preplasmocitos).

5 Como se informa en el presente documento se ha desarrollado un marcado por inmunofluorescencia para la selección de linfocitos B IgG<sup>+</sup> maduros, tal como linfocitos B de memoria, plasmoblastos y plasmocitos. Para una selección o enriquecimiento de linfocitos B las células se marcan bien de forma simple, doble o triple. También se requiere un marcado que dé lugar a aproximadamente de un 0,1 % a un 2,5 % de células marcadas de la población de células total. En un modo de realización se depositan linfocitos B como células simples seleccionadas mediante el marcado de moléculas de superficie presentes en un 0,1 % a un 2,5 % de los linfocitos B en la población, en otro modo de realización en un 0,3 % a un 1,5 % de los linfocitos B de la población, en uno modo de realización adicional en un 0,5 % a un 1 % de los linfocitos B de la población.

15 De un 0,5 % a un 1 % de los linfocitos B IgG<sup>+</sup> dentro de la población de PBMC se pueden marcar doblemente como células IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, células IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y células IgG<sup>+</sup>CD268<sup>+</sup>. Por tanto, en un modo realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> o linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD268<sup>+</sup>.

20 De los linfocitos B IgG<sup>-</sup> dentro de la población de PBMC, de un 0,5 % a un 1 % se pueden marcar doblemente como células IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>. Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>.

25 El marcado de células CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> o células CD3<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> da lugar a que se marque aproximadamente un 1,5% de las células de la población celular que va a marcarse, respectivamente. Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> o linfocitos B CD3<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>.

30 De los linfocitos B de hámster IgG<sup>-</sup> dentro de la población de PBMC, un 0,6 % ± 0,1 % se pueden marcar doblemente como linfocitos B de hámster IgG<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>. Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en este documento se depositan como células simples linfocitos B de hámster IgG<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>.

35 En un modo de realización se depositan linfocitos B IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> como células simples a partir de de linfocitos B obtenidos de un animal inmunizado. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> como células simples a partir de linfocitos B obtenidos de un animal no inmunizado. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> como células simples a partir de linfocitos B obtenidos de un animal no inmunizado o inmunizado. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B murinos IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>. Esta etapa de selección da lugar a un rendimiento mejor o incluso el mayor de los pocillos de IgG<sup>+</sup> en la etapa de cocultivo posterior. En otro modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B murinos IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>. Con esto las células que producen la mayor cantidad de clones de linfocitos B se seleccionan en primer lugar y en segundo lugar la mayor concentración de IgG (véase la tabla 5). En otro modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> murinos y linfocitos B IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> murinos. En un modo de realización específico el procedimiento tiene lugar con la condición de que, si las células son de conejo, el marcado no es de linfocitos B IgG<sup>+</sup> y/o linfocitos B CD138<sup>+</sup>.

50 Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup> murinos con el anticuerpo IgG anti-ratón 227 (Ab 227), se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup> de hámster con el anticuerpo IgG anti-hámster 213 (AB 213) y/o el anticuerpo IgG anti-hámster 225 (AB 225), y se pueden marcar linfocitos B de conejo con el anticuerpo anti-IgG 184 (véase la tabla 4).

**Tabla 4:** Marcado con inmunofluorescencia de linfocitos B – la tabla presenta la fracción marcada media de la población de linfocitos B murinos (A-E), linfocitos B de hámster (F-H) y linfocitos B de conejo (I-J).

	Marcado con IgG simple	Marcado con IgG <sup>+</sup> CD19	Marcado con IgG <sup>+</sup> IgM
A	IgG <sup>+</sup> AB 185 PE 17 % ± 3% n = 4	-	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 185 PE, AB 219 APC 12 % n = 1
B	IgG <sup>+</sup> AB 215 APC 12 % ± 3 % n = 5	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> AB 215 APC, AB 218PE 11 % n = 1	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 215 APC, AB 200 PE 14 % n = 1
C	IgG <sup>+</sup> AB 217 FITC 17 % ± 4 % n = 7	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> AB 217 FITC, AB 218 PE 10 % n = 1	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 217 FITC, AB 200 PE 19 % n = 1

ES 2 632 928 T3

D	IgG <sup>+</sup> AB 222 FITC 18 % ± 2 % n = 3	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> AB222 FITC, AB 218 PE 15 % n = 1	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 222 FITC, AB 200 PE 14 % n = 1
E	IgG <sup>+</sup> AB 227 FITC 0,8 % ± 0,3 % n = 13	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> AB 227 FITC, AB 218 PE 0,5 % n = 1	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 227 FITC, AB 200 PE 0,2 % n = 1
F	IgG <sup>+</sup> AB 212 FITC 43 % ± 6 % n = 7	Sin marcador de linfocitos B conocido	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 212 FITC, AB 223 APC 43 % n = 1
G	IgG <sup>+</sup> AB 213 APC 0,9 % ± 0,4 % n = 27	Sin marcador de linfocitos B conocido	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 213 APC, AB 224 FITC 0,07 % n = 1
H	IgG <sup>+</sup> AB 225 PE 17 % ± 3 % n = 5	Sin marcador de linfocitos B conocido	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> AB 225 PE, AB 224 FITC 0,7 % n = 1
I	IgG <sup>+</sup> AB 120 PE >10 %	-	-
J	IgG <sup>+</sup> AB 184 FITC 0,3 – 2 %	-	-

AB 120 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Southern Biotech	4030-09
AB 184 - anticuerpo Fc IgG anti-ratón de cabra	AbDSerotech	STAR121F
AB 185 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Caltag	M35004-3
AB200 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Invitrogen	M31504
AB212 - anticuerpo IgG anti-hámster de cabra	AbDSerotech	STAR79F
AB213 - anticuerpo IgG anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554010
AB215 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Sigma	B 0529
AB217 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	AbDSerotech	STAR120F
AB218 - anticuerpo CD19 anti-ratón de rata	Abeam	ab22480
AB219 - anticuerpo IgM anti-ratón de cabra	Rockland	710-1607
AB222 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Abeam	ab7064
AB223 - anticuerpo IgM anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554035
AB224 - anticuerpo IgM anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554033
AB225 - anticuerpo IgG anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554056
AB227 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Sigma	F 8264

PE: Ficoeritrina

APC: Alociocianina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Se tiene que indicar que no todos los anticuerpos comercialmente disponibles se pueden usar para el mercado debido a su baja o inexistente especificidad.

5 Se pueden marcar linfocitos B de ratón con el anticuerpo anti-IgG 227, se pueden marcar linfocitos B de hámster con el anticuerpo anti-IgG 213.

10 Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> murinos con anticuerpo 227 y anticuerpo 218.

Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> murinos con anticuerpo 227 y anticuerpo 219.

Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> de hámster con anticuerpo 213 y anticuerpo 224.

15 Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup> de conejo con anticuerpo 184.

Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> de conejo con anticuerpo 184, y anticuerpo 254 y SA 263.

20 Se pueden marcar linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> de conejo con anticuerpo 259 y anticuerpo 256.

Se pueden marcar linfocitos B de ratón con el anticuerpo anti-CD27 235 o 236 (AB 235, AB 236), el anticuerpo anti-CD38 192 (AB 192), el anticuerpo anti-CD138 233 (AB 233) y el anticuerpo anti-CD268 246 (AB 246).

**Tabla 5:** Marcado por inmunofluorescencia para la determinación de linfocitos B de ratón (A-J), hámster (K) y conejo (L-N) maduros.

marcado	Marcado por inmunofluorescencia para separación de linfocitos B	Porcentaje de todas las células viables %
A	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 218 PE	0,5 ± 0,2 n = 14
B	IgG <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 192 PE	0,8 ± 0,5 n = 9
C	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 233 PE	0,06 ± 0,07 n = 6
D	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 233 PE	0,6 ± 0,5 n = 6
E	IgG <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 235 PE	0,1 ± 0,1 n = 8
F	CD27 <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> - AB 236 A647, AB 233 PE	1,5 ± 0,5 n = 2
G	CD27 <sup>+</sup> IgG <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> - AB 235 PE, AB 227 FITC, AB 241 A647	0,10 ± 0,04 n = 3
H	CD3 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> - AB 189 FITC, AB 235 PE	1,33 n = 1
I	IgG <sup>+</sup> CD268 <sup>+</sup> - AB 227 FITC, AB 246 A647	0,8 n = 1
J	CD38 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> - AB 192 A647, AB 189 PE	12 ± 7 n = 2
K	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> - AB 213 A647, AB 224 FITC	0,6 ± 0,1 n = 15
L	IgG <sup>+</sup> - AB 184 FITC	0,6 ± 0,2, n = 5
M	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> - AB 184 FITC, AB 254 Biotina, SA 263 PE	0,4 ± 0,2, n = 2
N	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> - AB 259, AB 256 PE	0,3 ± 0,1, n = 5

AB 184 - anticuerpo IgG anti-conejo de cabra	AbD Serotec	STAR121F
AB 189 - anticuerpo CD3 anti-ratón de hámster	Becton Dickinson	553062
AB 192 - anticuerpo CD38 anti-ratón de rata	Becton Dickinson	553764
AB213 - anticuerpo IgG anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554010
AB218 - anticuerpo CD19 anti-ratón de rata	Abcam	ab22480
AB224 - anticuerpo IgG anti-hámster de ratón	Becton Dickinson	554033
AB227 - anticuerpo IgG anti-ratón de cabra	Sigma	F 8264
AB233 - anticuerpo CD138 anti-ratón de rata	Becton Dickinson	553714
AB235 - anticuerpo CD27 anti-ratón de hámster	Becton Dickinson	558754
AB236 - anticuerpo CD27 anti-ratón de hámster	Becton Dickinson	558753
AB241 - anticuerpo CD3 anti-ratón de hámster	Becton Dickinson	553060
AB246 - anticuerpo BAFF-R anti-ratón de rata	eBioscience	51-5943
AB254 - anticuerpo IgM anti-conejo de ratón	Becton Dickinson	personalizado
AB256 - anticuerpo IgG anti-rata de cabra	Southern Biotech	3030-09
AB259 - anticuerpo CD138 anti-conejo de rata	Roche Glycart AG	
SA 263 - Estreptavidina	Invitrogen	S866
A647: Alexa Fluor® 647		
FITC: Isotiocianato de fluoresceína		

10 En un modo de realización los procedimientos comprenden la etapa de reducir la población de linfocitos B de macrófagos y enriquecer los linfocitos B de la población de linfocitos B que segregan anticuerpos que se unen de forma específica a un antígeno diana.

**Depósito de células simples:**

15 El procedimiento del que se informa en el presente documento comprende la etapa de depositar los linfocitos B de una población de linfocitos B como células simples. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento el depósito como células simples es por separación de células activadas

con fluorescencia (FACS). El marcado requerido para el depósito de células simples por FACS se puede llevar a cabo como se indica en la sección previa.

En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B marcados específicamente. En un modo de realización adicional de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento el marcado es un marcado de marcadores de superficie celular con anticuerpos marcados con fluorescencia. En otro modo de realización los procedimientos de los que se informa en el presente documento proporcionan anticuerpos monoclonales. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B maduros.

Se ha encontrado también que una etapa de centrifugación adicional después del depósito en células simples y antes del cocultivo proporciona un número mayor de células que segregan anticuerpo y aumenta la cantidad de IgG segregada (ejemplo de animal de laboratorio con locus de inmunoglobulina humano, véase la tabla 6).

**Tabla 6:** Pocillos positivos para IgG/clones de células con y sin etapa de centrifugación tras el depósito en células simples.

ELISA de huCk	con etapa de centrifugación	de sin etapa de centrifugación
Pocillos huCk <sup>+</sup> [n]	9	1
Pocillos huCk <sup>+</sup> [% total de pocillos]	13	1
Cono huCk, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [promedio ng/ml]	76,4	9,7

En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento el procedimiento comprende la etapa de centrifugar las células depositadas simples antes del cocultivo. En un modo de realización específica la centrifugación es durante 5 minutos a 300 × g.

**Cocultivo**

La etapa de cocultivo con células alimentadoras puede ir precedida y, por tanto, tener lugar con un número de etapas adicionales.

En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento los linfocitos B depositados simples se cocultivan con células EL-4 B5 murinas como células alimentadoras en presencia de una mezcla alimentadora que comprende IL-1β, TNFα, IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6. Mediante marcado con inmunofluorescencia adecuada como se ha indicado anteriormente se puede conseguir un aumento del rendimiento de la etapa de cocultivo (número de pocillos con IgG/clones de células así como concentración de IgG) y también un enriquecimiento o aislamiento de linfocitos B IgG maduros de PBMC.

Con el depósito en células simples de linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> y/o IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> de PBMC aisladas frescas se puede obtener el mayor número de clones pocillos con IgG/clones de células. Con el depósito en células simples de linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y/o IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> tras la reducción de macrófagos o células específicas para KLH (hemocianina de lapa) se pueden obtener buenos resultados. Con el depósito en células simples de linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y/o IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> tras la reducción de linfocitos B específicos del antígeno se pueden obtener mejores resultados. Por tanto, en un modo realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y/o IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> como células simples.

Se ha encontrado que una célula simple que se deposita a partir de un marcado como se ha indicado anteriormente da lugar a la mayor fracción de pocillos IgG<sup>+</sup>/clones de células en los pocillos/clones de célula con la mayor concentración de IgG en el sobrenadante. Por tanto, en otro modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simple linfocitos B IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> y/o IgG<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> murinos. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en este documento se depositan como células simples linfocitos B de hámster IgG<sup>+</sup>IgM. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se depositan como células simples linfocitos B CD138<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup> y/o IgG<sup>-</sup>, y/o linfocitos B de conejo CD138<sup>+</sup> y/o IgG<sup>+</sup>IgM.

**Tabla 7:** Rendimiento en el cocultivo dependiendo del marcado por inmunofluorescencia.

marcado	n <sub>total</sub> de pocillos aisl/red/enr	Pocillos IgG <sup>+</sup> de n <sub>total</sub> de pocillos (%)			concentración media de IgG [ng/ml]			
		aisl.	red.	enr.	aisl.	red.	enr.	
ratón	IgG <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	356/356/324	45	50	37	68	46	42
	IgG <sup>+</sup>	-/144/144	-	32	7	-	34	31

	IgG <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	72/190/190	36	41	43	37	26	27
	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	72/72/72	3	13	12	22	59	43
	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	36/108/48	19	52	37	55	31	51
	IgG <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	64/64/64	4	28	20	102	54	32
	CD27 <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	-/32/-	-	6	-	-	135	-
	CD27 <sup>+</sup> IgG <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	72/72/72	14	0	14	4	0	0
	CD3 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	-/32/-	-	13	-	-	29	-
hámster	IgG <sup>+</sup> CD268 <sup>+</sup>	-/72/-	-	35	-	-	93	-
	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	-/216/216	-	17	22	-	78	93
	IgG <sup>+</sup>	-/216/216	-	10	35	1	71	64
conejo	IgG <sup>+</sup>	-/1512/1307	-	33	28	-	59	60
	IgG <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	-/76/-	-	29	-	-	5	-
	CD138 <sup>+</sup>	-/2016/-	-	14	-	-	16	-
	IgG <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	-/168/-	-	37	-	-	64	-

5 Para linfocitos B de ratón con el depósito en células simples de células IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> después de cada etapa de enriquecimiento (enr.) y/o reducción (red.) se puede obtener el mayor número de pocillos IgG<sup>+</sup>/clones de células después del cocultivo. De forma alternativa, con el depósito en células simples de células IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> se puede obtener pocillos/clones de células con la mejor concentración de IgG en el sobrenadante. El depósito en células simples de células IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> se puede usar para linfocitos B de animales inmunizados. El depósito en células simples de células IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> se puede usar para linfocitos B de animales no inmunizados. El depósito en células simples de células IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> se puede usar para linfocitos B de hámster animales no inmunizados. El depósito en células simples de linfocitos B IgG<sup>+</sup>, y/o IgG<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>, y/o CD138<sup>+</sup> y/o IgG<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> se puede usar para linfocitos B de conejo.

15 El marcado por inmunofluorescencia usado para linfocitos B obtenidos de sangre de un animal de laboratorio se puede usar también para el marcado de linfocitos B obtenidos del bazo y otros órganos inmunitarios de un animal de laboratorio, tal como ratón, hámster y conejo. Para linfocitos B de ratón la fracción de linfocitos B IgG<sup>+</sup> del bazo fue de aproximadamente un 0,8 % en comparación con un 0,4 % para células IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>. Para linfocitos B de hámster los números respectivos son un 1,9 % y un 0,5 % de células IgG<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>. Para linfocitos B derivados de sangre de conejo se encontró después de la reducción de macrófagos un 0,2 % de células IgG<sup>+</sup>. Placas de Peyer de conejo mostraron un 0,4 % de células IgG<sup>+</sup> y el bazo mostró un 0,3 % de células IgG<sup>+</sup> después de la reducción de macrófagos.

20 Con los procedimientos de los que se informa en el presente documento después de aproximadamente siete (7) días, es decir, después de 5, 6, 7 u 8 días, especialmente después de 7 u 8 días, de cocultivo se pueden obtener concentraciones de anticuerpo de aproximadamente 30 ng/ml hasta 15 µg/ml o más (valor medio de aproximadamente 500 ng/ml). Con la cantidad de anticuerpo proporcionada de este modo se puede llevar a cabo con mayor detalle un número elevado de diferentes análisis para caracterizar el anticuerpo, por ejemplo, en lo que respecta a la especificidad de unión. Con la mejor caracterización del anticuerpo en esta fase temprana en el procedimiento de cribado/selección es posible reducir el número de reacciones de secuenciación y aislamientos de ácido nucleico que tienen que llevarse a cabo. Adicionalmente, el clon de linfocitos B proporciona una cantidad de ARNm que codifica la región variable de la cadena ligera y pesada monoclonal, permitiendo el uso de un cebador de PCR degenerado y obvia el requerimiento de un cebador de alta especificidad. También se reduce el número requerido de ciclos de PCR. Por tanto, en un modo de realización la PCR con transcriptasa inversa es con cebador de PCR degenerado para el dominio variable de la cadena ligera y pesada.

35 La mezcla alimentadora puede ser un sobrenadante de cultivo de timocitos. El sobrenadante de cultivo de timocitos se puede obtener de los timocitos de la glándula del timo del respectivo animal joven. Es especialmente adecuado usar la glándula del timo de animales jóvenes en comparación con el aislamiento de timocitos de la sangre de animales adultos. El término «animal joven» denota un animal antes de que tenga la madurez sexual. Un hámster joven, por ejemplo, es de una edad inferior a 6 semanas, especialmente menos de 4 semanas. Un ratón joven, por ejemplo, es de una edad inferior a 8 semanas, especialmente menos de 5 semanas.

40 Debido al origen de la mezcla alimentadora, que se deriva del sobrenadante de timocitos cultivados (sobrenadante de cultivo de timocitos– TSN), tienen lugar variaciones considerables de un lote a otro. Para superar esta variabilidad se ha desarrollado una mezcla alimentadora sintética que consiste en componentes sintéticos. Una mezcla alimentadora consiste en IL-1β (interleucina-1 beta), TNFα (factor de necrosis tumoral alfa), IL-2 (interleucina-2) e IL-10 (interleucina-10) se conoce de Tucci, A., et al., J. Immunol. 148 (1992) 2778-2784.

50 Se informa en el presente documento de una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B depositados simples y células alimentadoras. También se informa en el presente documento de aditivos específicos de especies de linfocitos B para la mezcla alimentadora sintética para aumento de la cantidad de anticuerpo segregado por el clon de linfocitos B respectivo. Las células altamente productoras de forma concomitante contienen más ARNm que, a su vez, facilita la transcripción inversa y secuenciación del ácido nucleico codificante, por ejemplo

con un conjunto de cebadores no específicos redundantes.

Con la adición de SAC (células Cowans de la cepa *Staphylococcus aureus*, se usó un lote de SAC único) se puede aumentar el número de linfocitos B que segregan anticuerpo y la concentración de IgG media en el sobrenadante después del cocultivo. Se ha encontrado que, para la adición de SAC en el cocultivo, se puede definir un intervalo de concentración, ya que concentraciones reducidas o aumentadas de SAC reducen la cantidad de anticuerpo segregado.

**Tabla 8a:** Resultados de un ELISA de huCk (huCk = C kappa humano ) o ELISA de rblgG de sobrenadantes de cultivo celular de linfocitos B obtenidos de un animal de laboratorio con locus de IgG humano o un conejo de tipo natural (NZW) cocultivado con células alimentadoras EL-4 B5 y TSN como mezcla alimentadora con o sin SAC añadido.

	TSN	TSN + SAC
Pocillos huCk <sup>+</sup> [n]	7	45
Pocillos huCk <sup>+</sup> [% total de pocillos]	5	31
Cono huCk, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	89,1	41,0

	TSN		TSN + SAC	
	SAC 1:5000	SAC 1:10000	SAC 1:20000	SAC 1:40000
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	13	15	27	30
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	15	18	32	36
Cono rblgG, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	149,0	159,1	233,7	197,2

	con	SAC 1:20000	SAC 1:50000	SAC 1:100000	SAC 1:150000
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	12	75	93	92	72
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	5	30	37	37	29
Cono rblgG, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	199	665	742	774	668

Se puede apreciar que una relación de SAC de 1:20000 a 1:150000 proporciona un número mayor de pocillos de IgG<sup>+</sup>/clones de células, por lo que la relación de 1:50000 a 1:100000 muestra los mayores números. En un modo de realización la cantidad de SAC añadido al medio de cultivo se determina proporcionando una serie de dilución y determinando la dilución a la que el SAC añadido proporciona el mayor número de pocillos positivos para IgG/clones de células.

Se ha observado que mediante la adición de SAC a la mezcla alimentadora el cocultivo de linfocitos B se modificaba de forma sorprendente de manera que solo linfocitos B depositados simples tenían un beneficio en el crecimiento, mientras que el crecimiento de los linfocitos B estaba inhibido cuando se usaba una mezcla de PBL (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T endógenos) para cocultivo.

**Tabla 8b:** Resultados de un ELISA de huCk o ELISA de rblgG de sobrenadantes de cultivo celular de PBL y linfocitos B depositados simples cocultivados con células alimentadoras EL-4 B5 y TSN como mezcla alimentadora con SAC añadido.

ELISA de rblgG	PBL* (30 células)	Linfocitos B rblgG <sup>+</sup> depositados simples
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	8	104
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	6	58
Cono huCk, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [promedio ng/ml]	55,0	129,2

\* con deficit de macrófagos

Se presentan datos adicionales obtenidos con diferentes mezclas alimentadoras en las siguientes tablas 9 y 10.

En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B comprende IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-21 (interleucina-21). En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B comprende IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10 y SAC. En un modo de

realización específico, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-21 son IL-1 $\beta$  murina, TNF $\alpha$  murino, IL-2 murina, IL-10 murina e IL-21 murina recombinantes.

5 En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B murinos comprende IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-10, TNF- $\alpha$  y BAFF. En un modo de realización específico se añade BAFF a una concentración de 5 ng/ml.

10 En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de hámster comprende IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 y SAC. En un modo de realización específico se añade la IL-6 a una concentración de 10 ng/ml. En un modo de realización específico se añade SAC en una proporción de 1:75.000.

15 **Tabla 9:** Resultados de un ELISA de rblgG de sobrenadantes de cultivo celular de linfocitos B de conejo cocultivados con células alimentadoras EL-4 B5 y diferentes mezclas alimentadoras sintéticas comprende sustancias murina recombinantes en diferentes concentraciones.

	TSN de conejo, SAC	IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10	IL-6, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10	IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10	IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2	IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10	IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	37	24	12	16	18	23	24
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	51	33	17	22	25	32	33
Cono rblgG, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	196,0	289,9	32,4	75,7	166,4	134,4	203,6

20 **Tabla 10:** Pocillos IgG<sup>+</sup> de sobrenadantes de cultivo celular de linfocitos B de conejo cocultivados con células alimentadoras EL-4 B5 y TSN o una mezcla alimentadora que comprende sustancias murinas recombinantes y SAC (rb = conejo, m = ratón).

Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	TSN + SAC	IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10 + SAC
puro	64	55
+ mIL21	22	25
+ mIL10	78	61
+ mIL21+mIL10	57	93
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]		
puro	25	22
+ mIL21	9	10
+ mIL10	31	24
+ mIL21+mIL10	23	37
Cono rblgG, de todos los pocillos rblgG <sup>+</sup> [Ø ng/ml]		
puro	312,3	662,3
+ mIL21	263,7	541,1
+ mIL10	553,0	522,3
+ mIL21+mIL10	422,6	307,5

25 Un cocultivo de células alimentadoras y linfocitos B murinos sin IL-2, sin IL-10, así como sin IL-2 e IL-10, da lugar a un aumento del rendimiento de pocillos IgG<sup>+</sup> a pesar de que se reduce la concentración de IgG. Sin TNF $\alpha$  la concentración de IgG se reduce también. Sin IL-1 $\beta$  no se encuentra IgG en el sobrenadante.

30 Un cocultivo de linfocitos B de hámster sin IL-2 o sin IL-10, respectivamente, da lugar a pocillos IgG<sup>+</sup> con concentración G detectable. En cambio, en un cocultivo sin IL-2 ni IL-10 casi no se puede detectar crecimiento de linfocitos B. En ausencia de TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  no se puede determinar secreción de IgG.

35 En presencia de células alimentadoras EL-4 B5 se requieren al menos IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  para el cocultivo de linfocitos B de ratón, hámster y conejo. Se pueden omitir IL-2 e IL-10 para el cocultivo de células murinas. Se pueden cultivar linfocitos B de hámster en ausencia de IL-2 o IL-10. Se pueden cultivar linfocitos B de conejo en ausencia de IL-2 o IL-10 o IL-6.

Para linfocitos B murinos y de hámster la adición de IL-4 a la mezcla alimentadora aumenta el número de pocillos IgG<sup>+</sup> /clones de célula, así como la concentración de IgG en el sobrenadante. Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora para el cocultivo de linfocitos B murinos o de hámster comprende IL-4.

5 La adición de IL-6 a la mezcla alimentadora para el cocultivo de linfocitos B murinos o linfocitos B de hámster da lugar a un número mayor de pocillos IgG<sup>+</sup>/clones en células o a mayor concentración de IgG, respectivamente. Por tanto, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la mezcla alimentadora para el cocultivo de linfocitos B murinos o linfocitos B de hámster comprende IL-6. En un modo de realización específico se añade la IL-6 a una concentración de 50 ng/ml. En un modo de realización específico se añade IL-6 a una concentración de 10 ng/ml si se requiere una concentración de IgG alta. En un modo de realización específico la adición de IL-6 es después de tres días de cocultivo de los linfocitos B seleccionados y células EL-4 B5.

15 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B y células alimentadoras EL-4 B5 que comprenden IL-1β, TNFα, IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.

20 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, TNFα, IL-2, IL-10 y SAC.

En el presente documento se informa de una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B murinos y células alimentadoras que consiste en IL-1β, TNFα, y opcionalmente comprende IL-21, y/o SAC, y/o BAFF y/o IL-6.

25 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B murinos y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, IL-2, IL-10, TNFα y BAFF.

Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B murinos o de hámster y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, TNFα, IL-2, IL-10 e IL-6.

30 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de hámster y células alimentadoras EL-4 B5 que consiste en IL-1β, TNFα e IL-10, y comprende opcionalmente IL-21 y/o SAC y/o BAFF.

35 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de hámster y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, IL-2, IL-10, TNFα, IL-6 y SAC.

Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de conejo y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, TNFα, IL-10 e IL-6.

40 Un aspecto del que se informa en el presente documento es una mezcla alimentadora sintética para el cocultivo de linfocitos B de conejo y células alimentadoras EL-4 B5 que comprende IL-1β, TNFα, IL-10, IL-6 o IL-2 y SAC.

45 En un modo de realización específico, IL-1β, TNFα, IL-2, IL-10 e IL-21 son IL-1β murina, TNFα murino, IL-2 murina, IL-10 murina e IL-21 murina recombinantes.

En un modo de realización específico se añade BAFF a una concentración de 5 ng/ml.

En un modo de realización específico se añade la IL-6 a una concentración de 10 ng/ml.

50 En un modo de realización específico se añade SAC en una proporción de 1:75.000.

En un modo de realización específico las células alimentadoras son células EL-4 B5 murinas.

55 La adición de un inhibidor de cierto canal de potasio (= PAP-1, 5-(4-fenoxibutoxi)psoraleno) aumenta de forma sorprendente la secreción de rblgG de linfocitos B de forma dependiente de la concentración sin reducción del número de clones de linfocitos B. Normalmente una citocina que induce rblgG se puede correlacionar productivamente con una reducción del número total de clones de linfocitos B. Esto no fue el caso con PAP-1.

60 **Tabla 11:** Resultados de ELISA de rblgG de sobrenadantes de cultivo celular de linfocitos B cocultivados con células alimentadoras EL-4 B5 en presencia de TSN y SAC (=con) y concentraciones diferentes de PAP-1. DMSO: disolvente para PAP-1 (1 μM).

	con	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	DMSO
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	53	72	69	93	80	76

Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	21	29	27	37	32	30
Cono huCk, de todos los pocillos huCk <sup>+</sup> [promedio ng/ml]	195,8	289,0	452,9	579,5	890,7	225,3

Con una concentración de TSN de un 7,5 % se puede obtener la mayor concentración de IgG en el sobrenadante.

5 **Tabla 12:** Influencia de TSN en el cocultivo. Una concentración de TSN de un 7,5 % da lugar a una mejora del crecimiento y la productividad de linfocitos B.

	SLS al 5 %	SLS al 7,5 %	SLS al 10 %
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	71	71	81
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	28	28	32
Cono rblgG, de todos los pocillos rblgG <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	246	512	372

10 Con un número de 30 000 células alimentadoras por pocillo de una placa de 96 pocillos se puede obtener el mayor número de pocillos IgG<sup>+</sup> en combinación con concentración de IgG en el sobrenadante. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento el número de células alimentadoras por linfocito B depositado simple es aproximadamente 30 000.

**Tabla 13:** Influencia de la cantidad de células alimentadoras EL-4 B5 en el cocultivo.

	20 000	22 000	24 000	30 000	35 000	40 000
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [n]	71	73	78	78	73	38
Pocillos rblgG <sup>+</sup> [% total de pocillos]	28	29	31	31	29	15
Cono rblgG, de todos los pocillos rblgG <sup>+</sup> [Ø ng/ml]	246	319	346	418	457	656

15 El co-cultivo es, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento, en placas multipocillo de poliestireno con pocillos con fondo redondo. El volumen de trabajo de los pocillos es, en un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento, de 50 µl a 250 µl. En un modo de realización específico los pocillos se recubren al menos parcialmente con un sustrato no fibroso preparado a partir de una combinación de resina plástica polimérica y moléculas anfipáticas, en la que la molécula anfipática comprende un resto hidrófilo y una región hidrófoba, en la que las regiones hidrófobas se anclan dentro del sustrato y los restos hidrófilos se exponen en el sustrato. En un modo de realización específico las moléculas anfipáticas se seleccionan de alquilamina etoxilada, poli(etilenimina), octildecamina o mezclas de los mismos (véase, por ejemplo, el documento EP 1 860 181).

20 **Caracterización de células cocultivadas:**

30 Para la determinación (cualitativa y cuantitativa) de la IgG segregada después del cocultivo se pueden usar, en general, todos los procedimientos conocidos por un experto en la técnica, tal como un ELISA. En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento se usa un ELISA. En un modo de realización específico para la determinación de IgG segregada por linfocitos B murinos se usa un ELISA con los anticuerpos anti-IgG AB 216 (anticuerpo de captura) y AB 215 (anticuerpo trazador). En un modo de realización específico para la determinación de IgG segregada por linfocitos B de hámster se usa un ELISA con los anticuerpos monoclonales AB 220 (anticuerpo de captura) y AB 213 (anticuerpo trazador).

35 Dependiendo de los resultados de la caracterización se puede obtener un clon de linfocitos B, es decir seleccionado. El término «clon» denota una población de linfocitos B en división y secretoras de anticuerpos que surge de/se origina en un linfocito B simple. Por tanto, un clon de linfocitos B produce un anticuerpo monoclonal.

40 **Aislamiento de ARNm, clonación y secuenciación:**

45 A partir de los linfocitos B el ARNm total se puede aislar y transcribir en ADNc. Con cebadores específicos se puede amplificar la región VH y VL de cognados que codifica ácido nucleico. Con la secuenciación del ácido nucleico así obtenido se confirmó que los anticuerpos obtenidos son anticuerpos monoclonales en la mayoría de los casos (71-95 %). También se puede observar de la secuenciación de los linfocitos B individuales que casi no se obtienen secuencias idénticas. Por tanto, el procedimiento proporciona anticuerpos de gran diversidad que se unen al mismo antígeno.

50 Los cebadores usados para la amplificación del ácido nucleico que codifica VH se pueden usar para ADNc obtenido de células del ratón NMRI, el hámster armenio, el ratón Balb/c así como el hámster sirio y el conejo.

En un modo de realización de todos los procedimientos de los que se informa en el presente documento la secuencia de aminoácidos se deriva del ácido nucleico que codifica VH amplificado y el punto exacto de inicio y final se identifica localizando las secuencias de aminoácido de EVQL/QVQL a VSS (región VH) y DIVM/DIQM a KLEIK (región VL).

5 El término «anticuerpo» denota una proteína que consiste en una o más cadenas de polipéptidos sustancialmente codificadas por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> así como también cadenas únicas (scFv), diacuerpos, formas monovalentes, bivalentes, trivalentes o tetravalentes, y también como forma biespecífica, trispecífica o tetraespecífica (por ejemplo, Huston, J.S., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al, Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood et al, Immunology, Benjamin N.Y., 2.ª edición (1984); y Hunkapiller, T. y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).

15 En el presente documento también se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una población de linfocitos B (maduros) (obtenidos de sangre de un animal de laboratorio),
- b) colorear las células de la población de linfocitos B con al menos un colorante fluorescente (en un modo de realización con uno a tres, o dos a tres colorantes fluorescentes),
- c) depositar células simples de la población coloreada de linfocitos B en recipientes individuales (en un modo de realización el recipiente es un pocillo de una placa multipocillo),
- d) cultivar los linfocitos B individuales depositados en presencia de células alimentadoras EL-4 B5 y una mezcla alimentadora que comprende IL-1β, TNFα, IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.
- e) determinar la especificidad de unión de los anticuerpos segregados en el cultivo de los linfocitos B individuales,
- f) determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera y pesada de anticuerpos que se unen de forma específica mediante PCR con transcriptasa inversa y secuenciación de nucleótidos, y, de este modo, obtener un dominio variable de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que codifica ácido nucleico,
- g) introducir el dominio variable de la 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 del sobrenadante de células o de cultivo celular y, de este modo, producir un anticuerpo.

35 Un «casete de expresión» se refiere a una construcción que contiene los elementos regulatorios necesarios, tales como promotor y sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

40 El término «animal de laboratorio» denota un mamífero no humano. En un modo de realización el animal de laboratorio se selecciona de rata, ratón, hámster, conejo, primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollo, anfibios, y reptiles.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

45 **Ejemplos**

**Ejemplo 1**

**Medios y tampones:**

- 50 El tampón de bloqueo para ELISA comprende IX PBS y BSA al 1 %.
- El tampón de recubrimiento para ELISA comprende 4,29 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>\* 10 H<sub>2</sub>O y 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>; añadir agua hasta un volumen final de 1 litro, pH 9,6 ajustado con HCl 2 N.
- 55 La solución de etanol para aislamiento de ARN comprende etanol al 70 % o etanol al 80 %.
- El tampón FACS para tinción por inmunofluorescencia comprende IX PBS y BSA al 1 %.
- 60 El tampón IMDM para ELISA comprende IX PBS, IMDM al 5 % y BSA al 0,5 %.
- El tampón de incubación 1 para ELISA comprende IX PBS y CroteinC al 0,5 %.
- El tampón de incubación 2 para ELISA comprende IX PBS, CroteinC al 0,5 % y Tween 20 al 0,02 %.
- 65 El tampón de incubación 3 para ELISA comprende IX PBS y BSA al 0,1 %.

El tampón de incubación 4 para ELISA comprende IX PBS, BSA al 0,5 %, Tween al 0,05 %, PBS (10X), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 1,37 M, KC1 0,027 M, pH 7,0.

5 El tampón PCR comprende KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 9,0.

El tampón de lavado 1 para ELISA comprende IX PBS, Tween 20 al 0,05 %.

El tampón de lavado 2 para ELISA comprende IX PBS, Tween 20 al 0,1 %.

10

El tampón de lavado 3 para ELISA comprende agua, NaCl al 0,9 %, Tween 20 al 0,05 %.

El medio EL-4 B5 comprende PML1640, FCS al 10 %, mezcla de glutamina/penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 100 mM al 2 %, tampón HEPES 1 M al 1 %.

15

### **Ejemplo 2**

#### **Cuidado animal e inmunización**

20 Los animales de laboratorio se mantuvieron de acuerdo con la legislación de protección animal alemana (TierSCHG) así como de acuerdo con las respectivas directrices europeas.

Se recibieron ratones y hámsters a una edad de 6 a 8 semanas y se inmunizaron antes de una edad de 12 semanas. El antígeno se aplicó en primer lugar junto con adyuvante de Freud completo (CFA). Las aplicaciones adicionales fueron con adyuvante de Freud incompleto (IFA). El antígeno que contenía emulsión se aplicó por vía subcutánea, por lo que la emulsión comprendía una cantidad de 50 a 100 µg de antígeno dependiendo del peso del animal de laboratorio receptor.

25

Se usaron conejos NZW (Charles River Laboratories International, Inc.) para inmunización. Se disolvió el antígeno en tampón de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló (1:1) con adyuvante de Freud completo (CFA) hasta la generación de emulsión estable. Los conejos recibieron una inyección intradérmica (i.d.) de 2 ml de emulsión seguida de una segunda inyección intramuscular (i.m.) y una tercera subcutánea (s.c.), cada una de 1 ml, en un intervalo de una semana. La cuarta inyección i.m. de 1 ml se llevó a cabo dos semanas después, seguida de dos inyecciones s.c. adicionales de 1 ml en un intervalo de cuatro semanas.

30

35

Durante la inmunización se determinó el título de anticuerpos en suero con un ensayo específico para el antígeno. A un título de anticuerpos con una CI<sub>50</sub> de 1:10000 se extrajo la sangre o el bazo del animal inmunizado. Para reactivación de linfocitos B específicos del antígeno se aplicó por vía intravenosa 30 µg a 50 µg del antígeno al animal de laboratorio tres días antes de la extracción de la sangre o del bazo.

40

### **Ejemplo 3**

#### **Extracción de órganos, sangre y macrófagos**

45 Se obtuvo sangre de ratones y hámsters por punción de la vena retrobulbérica. Se obtuvo sangre de conejos por punción de la vena de la oreja o, para grandes volúmenes, de la arteria de la oreja. Se recogió sangre completa (10 ml) de conejos 4-6 días después de la tercera, cuarta, quinta y sexta inmunización y se usó para la separación de células simples por FACS.

50 Se aislaron macrófagos de la sangre obtenida por unión al plástico del cultivo celular. Para ratones y hámsters, se puede obtener de cada animal aproximadamente  $3 \times 10^5$  macrófagos por este procedimiento.

Si se requería una gran cantidad de macrófagos de ratones o hámsters se aislaban macrófagos peritoneales. Para esto los animales tienen que tener al menos 3 meses de edad. Para la extracción de macrófagos peritoneales se sacrificaron los animales y se inyectó inmediatamente 5 ml de medio EL-4 B5 con una temperatura de 37 °C en la cavidad peritoneal. Tras masajear la barriga de los animales durante 5 minutos, se extrajo la solución que contenía las células.

55

### **Ejemplo 4**

60

#### **Cultivo de células EL-4 B5**

Se descongelaron rápidamente células EL-4 B5 congeladas en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron con 10 ml de medio EL-4 B5. Tras centrifugación a  $300 \times g$  durante 10 minutos se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el medio. Tras una etapa de centrifugación se desechó de nuevo el sobrenadante y se resuspendió y el sedimento en 1 ml de medio.

65

Se inocularon células EL-4 B5 a una densidad celular de  $3 \times 10^4$  células/ml en matraces de cultivo de 175 ml. La densidad celular se determinó cada segundo día y se ajustó a  $3 \times 10^4$  células/ml. Las células tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas y tienen que cultivarse a una densidad celular inferior a  $5 \times 10^5$  células/ml porque con mayor densidad celular se pierden las propiedades estimuladoras de las células.

Cuando el número de células totales era de aproximadamente  $1,5 \times 10^9$  células se extrajo el medio mediante centrifugación. Después de esto se irradiaron las células con 50 gray (5000 rad). Después de la determinación del número de células viables mediante tinción con azul de tripano se obtuvieron alícuotas de entre  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células y se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para el cocultivo se descongelaron las células y se lavaron dos veces con medio EL-4 B5. Para la determinación del número de células viables se diluye la suspensión celular 1:10 con solución de azul de tripano al 0,4 % (p/v) y se transfieren 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla a una cámara de conteo de Neubauer y se contó el número de células.

### **Ejemplo 5**

#### **Centrifugación por gradiente de densidad**

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se llevó a cabo mediante separación por gradiente de densidad con Lympholyte® de acuerdo con las instrucciones del fabricante A (Lympholyte®-mammal, Cedarlane).

Se diluyó sangre extraída a 2:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un vial de centrifuga se proporcionó el mismo volumen de medio de separación por densidad y la sangre diluida se añadió cuidadosamente a través de la pared del vial. El vial se centrifugó durante 20 minutos a  $800 \times g$  sin frenado. Los linfocitos se obtuvieron de la capa provisional blanca. Las células extraídas se suplementaron con 10 ml de PBS y se centrifugaron a  $800 \times g$  durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió, se lavó y se centrifugó. El sedimento final se resuspendió en PBS.

### **Ejemplo 6**

#### **Lisis hipotónica de eritrocitos**

Para la destrucción de eritrocitos por lisis hipotónica se diluyó una solución de cloruro de amonio (BD Lyse™) a 1:10 con agua y se añadió en una proporción de 1:16 a sangre completa. Para la lisis de eritrocitos se incubó la mezcla durante 15 minutos en la oscuridad. Para la separación de los residuos celulares de células intactas se centrifugó la solución durante 10 minutos a  $800 \times g$ . El sobrenadante se desechó, se resuspendió el sedimento en PBS, se lavó de nuevo, se centrifugó y se resuspendió el sedimento en PBS.

### **Ejemplo 7**

#### **Preparación de células de órganos internos de un animal de laboratorio**

Para la preparación de células de bazo y timo se diseccionó el órgano respectivo en una placa de Petri y se recogieron las células en PBS. Para la extracción del tejido restante se filtró la suspensión celular a través de un tamiz de  $100 \mu\text{m}$ . Para la obtención de linfocitos de células de bazo se usó centrifugación por gradiente de densidad. Para las células del timo no se requirió una etapa de enriquecimiento adicional.

### **Ejemplo 8**

#### **Reducción de macrófagos**

Se usaron placas de 6 pocillos estériles (calidad de cultivo celular) para reducir macrófagos y monocitos mediante adhesión inespecífica. Se recubrieron pocillos bien con KLH (hemocianina de lapa) o con estreptavidina y los péptidos de control. Cada pocillo se rellenó con 3 ml hasta un máximo 4 ml de medio y hasta  $6 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica del conejo inmunizado y se dejaron unirse durante 60 a 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en la estufa de incubación. Después de esto el sobrenadante que contenía los linfocitos se transfirió a un vial de centrifugación y se centrifugó a  $800 \times g$  durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en PBS.

Se usaron el 50 % de las células en el sobrenadante para la etapa de adsorción; el 50 % de células restantes se sometieron directamente a tinción con inmunofluorescencia y separación de células simples.

**Ejemplo 9****Reducción de linfocitos B específicos de KLH**

5 Se incubaron cuatro mililitros de una solución que contenía hemocianina de lapa (KLH) con tampón de recubrimiento a una concentración de 2 µg/ml en los pocillos de una placa multipocillo durante la noche a temperatura ambiente. Antes de la etapa de reducción se extrajo el sobrenadante y se lavaron los pocillos dos veces con PBS. Después, se ajustaron las células sanguíneas a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml y se añadieron 3 ml a cada pocillo de una placa multipocillo. Después, se incubó la placa multipocillo durante 60 a 90 minutos a 37 °C. Se transfirió el sobrenadante a un vial de centrifugación y se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se combinaron los sobrenadantes en el vial de centrifugación. Se sedimentaron las células por centrifugación a  $800 \times g$  durante 10 minutos y se resuspendió el sedimento en PBS.

**Ejemplo 10****Enriquecimiento de linfocitos B específicos de antígeno**

20 Se diluyó el antígeno respectivo con tampón de recubrimiento hasta una concentración final de 2 µg/ml. Se añadieron 3 ml de esta solución al pocillo de una placa multipocillo de 6 pocillos y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Antes del uso se extrajo el sobrenadante y se lavaron los pocillos dos veces con PBS. Se ajustó la solución de linfocitos B hasta una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y se añadieron 3 ml a cada pocillo de una placa multipocillo de 6 pocillos. Se incubó la placa durante 60 a 90 minutos a 37 °C. Se extrajo el sobrenadante y se lavaron los pocillos de dos a cuatro veces con PBS. Para la recuperación de linfocitos B específicos del antígeno se añadió 1 ml de una solución de tripsina/EDTA a los pocillos de la placa multipocillo y se incubó durante 10 a 15 minutos a 37 °C. Se detuvo la incubación mediante adición de medio y se transfirió el sobrenadante a un vial de centrifugación. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se combinaron los sobrenadantes con los otros sobrenadantes. Se sedimentaron las células por centrifugación durante 10 minutos a  $800 \times g$ . Se resuspendió el sedimento en PBS.

30

**Ejemplo 11****Cocultivo de linfocitos B y células EL-4 B5**

35 A) Se llevó a cabo el cocultivo en placas de 96 pocillos con fondo redondo. Se preparó una solución base que comprendía células EL-4 B5 ( $1,6 \times 10^6$  células/15,2 ml) y citocinas en medio EL-4 B5. Se añadieron 200 µl de la solución base a cada pocillo de la placa multipocillo. Se añadió a cada pocillo un linfocito B simple mediante separación de células activadas por fluorescencia. Después de la adición de los linfocitos B se centrifugó la placa durante 5 minutos a  $300 \times g$ . Se incubó la placa durante siete días a 37 °C.

40

b) Se cultivaron linfocitos B simples separados en placas de 96 pocillos con 210 µl/pocillo de medio EL-4 B5 con Pansorbin Cells (1:20000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), 5 % de sobrenadante de timocitos de conejo y células de timoma murino EL-4-B5 irradiadas con radiación gamma ( $2 \times 10^4$ /pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en la estufa de incubación. Se extrajeron los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B para seguimiento y se cosecharon células inmediatamente para la clonación o congelación del gen de la región variable a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

45

**Ejemplo 12****Cultivo de linfocitos T**

50 Se aislaron los linfocitos T del timo de ratones y hámsters de 3-4 semanas de edad o de conejos de 4-5 semanas de edad, respectivamente. Se centrifugaron las células y se cultivaron o se congelaron inmediatamente en alícuotas de  $3 \times 10^7$  células. Se sembraron los timocitos con una densidad celular mínima de  $5 \times 10^5$  células/ml de medio EL-4 B5 en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

55

**Ejemplo 13****Cultivo de macrófagos**

60

Se aislaron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones y hámsters, respectivamente, de una edad de al menos tres meses. Se cultivaron macrófagos peritoneales de ratones y hámsters, o células mononucleares de sangre de conejos en medio EL-4 B5 a una densidad celular de al menos  $1 \times 10^5$  células/ml en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> durante 1,5 horas a 37 °C. Después, se extrajo el medio y se extrajeron las células no unidas de los macrófagos unidos por lavado con medio EL-4 B5 caliente, seguido de cultivo durante 48 horas en 35 ml de medio.

65

**Ejemplo 14****Cocultivo de linfocitos T y macrófagos**

Se cultivaron linfocitos T y macrófagos durante 48 horas en matraces separados. Antes de combinar ambas poblaciones celulares se centrifugaron los linfocitos T durante 10 minutos a  $800 \times g$ . Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de medio. Se ajustaron los linfocitos T a una densidad celular mínima de  $5 \times 10^5$  células/ml y se añadieron 10 pg de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y 5 ng o 50 ng de fitohemaglutinina M (PHA-M) por ml de medio. Se extrajeron del medio de cultivo macrófagos y se añadió la suspensión de linfocitos T a los matraces que contenían macrófagos. Después de 36 horas de cocultivo se extrajo el medio de cultivo y se denominó solución TSN. Para la extracción de las células restantes se filtró la solución TSN a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$ . La solución TSN se congeló a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  en alícuotas de 4 ml.

**Ejemplo 15****Tinción con inmunofluorescencia**

Dependiendo del número de células que se tenían que teñir se proporcionaron las células en 100  $\mu\text{l}$  de medio (menos de  $10^6$  células) o 200  $\mu\text{l}$  de medio (más de  $10^6$  células), respectivamente. Se diluyó el anticuerpo marcado fluorescente con suero al 5 % del animal de laboratorio y tampón FACS hasta un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  o 200  $\mu\text{l}$ , respectivamente. Se incubó la mezcla de reacción en un bastidor con rodillos durante 40 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  en la oscuridad. Tras la incubación se lavaron las células dos veces a  $300 \times g$  durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 400  $\mu\text{l}$  de PBS y se filtró a través de un tamiz de  $70 \mu\text{m}$ . Se transfirió la solución filtrada a un vial con FACS y se tiñeron las células muertas directamente antes del experimento con FACS mediante adición de yoduro de propidio (6,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Si se marcaba el anticuerpo marcado con biotina, el anticuerpo se detectaba en una segunda etapa con Alexa Flour(R) 647 marcado con estreptavidina (anticuerpo 197).

**Ejemplo 16****Cuantificación de IgG**

La placa multipocillo de 96 pocillos en la que se llevó a cabo el cocultivo se centrifugó después de siete días de cocultivo a  $300 \times g$  durante 5 minutos, se extrajeron 150  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se diluyó en una proporción de 2:1 con PBS en una segunda placa multipocillo de 96 pocillos.

Se llevó a cabo el ELISA como se indica en el ejemplo 17.

El anticuerpo se usó a una concentración de 50 ng/ml. Si la DO era o superaba 1 tras un tiempo de incubación de 5 minutos se sometía a una serie de dilución de 0,8 a 108 ng/ml de IgG.

**Ejemplo 17****Detección de IgG específica del antígeno**

Se pueden caracterizar anticuerpos producidos por linfocitos B depositados y cocultivos simples o de linfocitos B obtenidos de un animal de laboratorio inmunizado con respecto a la unión específica a un antígeno. Se llevó a cabo el ELISA a temperatura ambiente y se incubó la solución de ELISA entre las etapas individuales en un agitador a  $20 \times g$ . En la primera etapa se unió el antígeno a los pocillos de una placa multipocillo de 96 pocillos. Si el antígeno era una proteína este se había diluido en tampón de recubrimiento y se aplicaba directamente a la placa. Se unieron antígenos peptídicos mediante la unión específica al par biotina/estreptavidina. Los pocillos de la placa multipocillo pueden estar ya recubiertos con CroteinC soluble (CrC) por el fabricante. En caso contrario los pocillos se incubaron tras la inmovilización del antígeno con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de bloqueo. Después de la incubación con 100  $\mu\text{l}$  de solución de antígeno por pocillo (placa multipocillo prerrecubierta) o 200  $\mu\text{l}$  de tampón de bloqueo, respectivamente, se extrajo el antígeno no unido o el tampón de bloqueo por lavado con tampón de lavado. Se añadieron sobrenadantes de linfocitos B diluidos a un volumen de 100  $\mu\text{l}$  por pocillo y se incubaron. Después de la incubación se lavaron los pocillos. Después, se añadió el anticuerpo de detección a un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . El anticuerpo se puede conjugar bien con peroxidasa de rábano picante o marcarse con biotina. El anticuerpo de detección se determinó con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación se lavó la placa multipocillo y después se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una solución sustrato que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) por pocillo y se incubó durante un periodo como se da en la tabla X. Se detuvo la reacción enzimática con la adición de 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico y se determinó la densidad óptica a 450 nm y 680 nm con un fotómetro (Rainbow Thermo ELISA Reader) y el software Xread plus.

**Ejemplo 18****Aislamiento de ácido ribonucleico (ARN)**

Las células de las que se tenía que aislar el ARN se sedimentaron en primer lugar mediante centrifugación. El sedimento celular se lisó mediante la adición de 100 µl de tampón RLT con 10 µl/ml de beta-mercaptoetanol. Se resuspendieron las células mediante mezclado múltiple con una pipeta. Se transfirió la solución a un pocillo de una placa multipocillo. Se agitó brevemente la placa a 200 × g y se congeló a -20 °C.

El aislamiento del ARN se llevó a cabo con el kit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ejemplo 19****Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa**

Se llevó a cabo la transcripción inversa en un volumen de 20 µl. Para cada reacción se realizó un control con y sin transcriptasa inversa. Se premezclaron por reacción 1 µl de dNTP (cada uno a 10 mM), 0,4 µl de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,2 µg) y 0,6 µl de hexámero aleatorio (0,03 µg), y se añadió a 8,5 µl de ARN en H<sub>2</sub>O. Se incubó la mezcla de reacción durante 5 minutos a 65 °C y después se transfirió directamente a hielo. Después se premezclaron 2 µl de tampón RT (10×), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl de DTT (0,1 M) y 1 µl de RNase Out™ (40 unidades) y se añadió a la mezcla de reacción enfriada con hielo. Después de un tiempo de incubación de 2 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0,5 µl de transcriptasa inversa Superscript™ II (25 unidades). Se incubó la mezcla de reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo la traducción durante 50 minutos a 42 °C. Después de la traducción se inactivó la transcriptasa inversa por incubación durante 15 minutos a 70 °C. El ADNc se conservó a -20 °C.

**Ejemplo 20****Reacción en cadena de la polimerasa**

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con el kit TaqPCR Core (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la PCR en un volumen de 20 µl. Se transfirieron las muestras al Mastercycler® a una temperatura de 95 °C.

**Ejemplo 21****Secuenciación**

Se determinaron todas las secuencias por SequiServe (Vaterstetten, Alemania).

**Ejemplo 22****Adsorción en antígeno****A) Recubrimiento de placas**

Biotina/Estreptavidina: Se incubaron placas de 6 pocillos (calidad de cultivo celular) recubiertas con estreptavidina estériles con antígeno biotinilado a una concentración de 0,5 a 2 µg/ml en PBS a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron placas en PBS estéril tres veces antes del uso.

Proteína unida covalentemente: Se recubrieron placas de 6 pocillos de cultivo celular con 2 µg/ml de proteína en tampón de carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, hidrogenocarbonato de disodio 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes del uso.

**B) Adsorción de linfocitos B sobre péptidos**

Se sembraron placas de cultivo de tejido de 6 pocillos recubiertas con el antígeno respectivo con hasta  $6 \times 10^6$  células por 4 ml de medio y se dejaron unirse durante una hora a 37 °C en la estufa de incubación. Se extrajeron las células no adherentes mediante lavado cuidadoso de los pocillos 1-2 veces con 1 × PBS. Las células pegajosas que quedaron se separaron con tripsina durante 10 minutos a 37 °C en la estufa de incubación y luego se lavaron dos veces en medio. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción inmunofluorescente.

**Reivindicaciones**

- 5 1. Procedimiento de selección de un linfocito B que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) cocultivar cada uno de los linfocitos B de una población de linfocitos B, que se ha depositado como célula simple, con células EL-4 B5 murinas como células alimentadoras,
- 10 b) seleccionar un clon de linfocitos B que haga proliferar y segregue anticuerpo en la etapa a), en la que el cocultivo es en presencia de una mezcla alimentadora sintética que comprende IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6.
- 15 2. Procedimiento para la producción de un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno diana que comprende las siguientes etapas:
- 20 a) cocultivar cada linfocito B de una población de linfocitos B, que se ha depositado como célula simple en un recipiente individual, en presencia de células EL-4 B5 murinas como células alimentadoras e IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, y uno o más seleccionados de IL-21, SAC, BAFF, IL-2, IL-4 e IL-6 como mezcla alimentadora,
- 20 b) seleccionar un clon de linfocitos B que produzca un anticuerpo que se una específicamente al antígeno diana,
- 25 b1) determinar la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo mediante PCR con transcriptasa inversa,
- 25 b2) transfectar una célula con un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo,
- 30 d) cultivar la célula, que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo producido por el clon de linfocitos B seleccionado en la etapa b), o una variante humanizada del mismo, y recuperar el anticuerpo del sobrenadante celular o de cultivo y con ello producir el anticuerpo.
- 35 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la etapa de incubar la población de linfocitos B en el medio de cocultivo antes del depósito de células simples.
- 40 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que la incubación es a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente una hora.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la etapa de centrifugar los linfocitos B depositados en células simples antes del cocultivo.
- 45 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que la centrifugación es durante aproximadamente 5 minutos, a aproximadamente 300 x g.
- 45 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los linfocitos B son linfocitos B maduros.
- 50 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los linfocitos B son linfocitos B de ratón, o linfocitos B de hámster o linfocitos B de conejo.
- 50 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cocultivo es en un medio RPML1640 suplementado con FCS al 10 % (v/v), un 1 % (p/v) de una solución de glutamina 200 mM que comprende penicilina y estreptomycin, un 2 % (v/v) de una solución de piruvato de sodio 100 mM y un 1 % (v/v) de un tampón de ácido 2-(4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin)-etanosulfónico 1 M (HEPES).