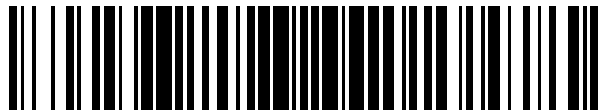


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 899**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0781 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 12175198 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2540820**

54 Título: **Medios y métodos para influir en la estabilidad de las células productoras de anticuerpos**

30 Prioridad:

12.06.2006 EP 06076211
09.12.2005 WO PCT/NL2005/000848

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

73 Titular/es:

ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM BIJ DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM (50.0%)
Meibergdreef 9
1105 AZ Amsterdam, NL y
AIMM THERAPEUTICS B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

SPITS, HERGEN;
SCHEEREN, FERENC ALEXANDER;
BEAUMONT, TIM y
DIEHL, SEAN ANDREW

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 660 899 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para influir en la estabilidad de las células productoras de anticuerpos

5 Los cultivos celulares *ex vivo* son herramientas importantes en las aplicaciones biológicas y médicas actuales. Una aplicación importante es cultivar las células productoras de anticuerpos para cosechar anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales (AcMo) representan múltiples copias idénticas de una única molécula de anticuerpo cuyas copias se unen a los antígenos con la misma afinidad y promueven las mismas funciones efectoras. Entre los beneficios de los AcMo está su especificidad por el mismo epítipo en un antígeno. Esta especificidad confiere determinadas ventajas clínicas en los AcMo en más tratamientos convencionales mientras ofrece a los pacientes una opción terapéutica eficaz y bien tolerada con efectos secundarios generalmente bajos. Además, los AcMo son útiles para la investigación biológica y médica.

15 La capacidad proliferativa de la mayoría de las células primarias en cultivo está limitada por la inducción de senescencia. Este estado de parada del crecimiento irreversible se caracteriza por la expresión de una serie de marcadores asociados con la senescencia, tales como la beta-galactosidasa asociada a la senescencia, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), p19^{ARF}, p53, p21^{CIP1}, y p16^{NK4A}. Para proporcionar una línea celular proliferante, las células a menudo se unen a células cancerosas para producir células de hibridoma. Las células de hibridoma resultantes son capaces de dividirse indefinidamente y crecer bien en los cultivos celulares. Los hibridomas individuales con una característica deseada pueden seleccionarse para un fin dado.

25 Para obtener directamente anticuerpos monoclonales humanos con una especificidad deseada, sería inconveniente aislar una célula B capaz de producir dicho anticuerpo y cultivar la célula B *ex vivo*. Sin embargo, la tecnología de los hibridomas con células B humanas no ha sido éxito porque los hibridomas resultantes son inestables. Se han llevado a cabo muchos intentos para el cultivo de células B *ex vivo*. Está bien documentado que las células B humanas vírgenes y de memoria pueden cultivarse durante un periodo de tiempo limitado después de la activación de CD40 en presencia de citocinas, incluyendo IL-2, IL-4 e IL-10 (Banchereau y otros, 1991) y se cree que este sistema imita la respuesta *in vivo* de las células B hacia células T auxiliares que expresan CD40L sensibilizadas con antígenos afines. En ausencia de unión a CD40, la IL-10 sola o combinada con IL-2 induce la diferenciación en células productoras de anticuerpos (Malisan y otros, 1996). Los mecanismos de regulación de la supervivencia y la proliferación de las células B maduras cultivadas en estas condiciones solamente se conocen parcialmente.

35 La activación de CD40 en las células B tiene múltiples efectos, incluyendo la protección contra la apoptosis, la inhibición (parcial) de la diferenciación y la inducción de la respuesta de las células B a las citocinas. La expresión de un gran número de inhibidores del ciclo celular disminuyó por la activación de CD40, incluyendo Rb-1 y Rb-2 (Dadgostar y otros, 2002) y es probable que la regulación por disminución de dichos genes libere a las células B en reposo de la quiescencia. Aunque la activación de CD40 conduce a una respuesta proliferativa breve, las citocinas son un instrumento para mantener la progresión del ciclo celular de las células B activadas. La IL-2 y la IL-4 son las citocinas más eficaces que promueven la progresión continua del ciclo celular de CD40 o de células B estimuladas por Ig en superficie. En cualquier caso, los cultivos de células B en los artículos mencionados anteriormente solo son estables durante un periodo de tiempo limitado.

45 Otro enfoque para inmortalizar las células B es la transformación del virus de Epstein-Barr virus (EBV). Sin embargo, la frecuencia de las células B que son transformadas por el EBV es baja y, por tanto, los intentos para generar células B transformadas con el EBV que producen los anticuerpos deseados han tenido poco éxito. Recientemente, Traggiai y otros han notificado un método para una transformación más eficiente del virus de Epstein-Barr de las células B que aumentó la frecuencia de células B transformadas. Con este método, las células B obtenidas de un paciente recuperado de una infección por coronavirus que produce el síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) se transformaron con el EBV y se aislaron clones de células B transformadas que producen anticuerpos monoclonales específicos del SARS y otras proteínas (Traggiai y otros, 2004).

55 Otro enfoque más para inmortalizar las células B se describe en la solicitud de patente WO 03/052083. Esta solicitud describe un método para estabilizar células B en donde las células B humanas se transducen con un transductor de la señal constitutivamente activo de la activación y la transcripción (CA-STAT). Se observó una vida prolongada de las células B. Las células B replicantes no fueron capaces, sin embargo, de producir anticuerpos al mismo tiempo. Los anticuerpos pueden obtenerse deteniendo la replicación de las células, lo que provoca la diferenciación terminal. Las células diferenciadas terminalmente produjeron anticuerpos durante un tiempo restringido, tras el cual las células diferenciadas murieron. Sin embargo, las células B replicantes del documento WO 03/052083 pierden su capacidad de desarrollarse en células productoras de anticuerpos después de cultivar 1,5-2 meses o más, lo que hace que estos cultivos de células B sean inadecuados para la producción de anticuerpos.

60 Aunque se han descrito varios enfoques para cultivar células productoras de anticuerpos, todavía existe la necesidad de medios y métodos para influir en la estabilidad de las células productoras de anticuerpos. Un objeto de la presente invención es proporcionar dichos medios y métodos.

65

Por consiguiente, la invención proporciona un método para aumentar la vida útil de replicación y/o la estabilidad de una célula productora de anticuerpos, que comprende

- 5 - proporcionar dicha célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional o derivado funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos; y
- 10 - proporcionar dicha célula productora de anticuerpo con una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL. La estabilidad de una célula productora de anticuerpos se define como la capacidad de dicha célula productora de anticuerpos para permanecer en una etapa del desarrollo determinada (opcionalmente después de haber llevado a dicha célula a dicha etapa). Diferentes etapas del desarrollo de una célula implican al menos una característica diferente de dicha célula. Por ejemplo, se conoce que una célula B de memoria se diferencia tras la estimulación en una célula plasmática secretora de anticuerpos a través de una etapa que algunos investigadores denominan plasmablastos. Una célula B de memoria, un plasmablasto y una célula plasmática son diferentes etapas del desarrollo de una célula B, en donde la célula B tiene diferentes características. Una célula B de memoria exhibe baja proliferación y secreción de anticuerpos. Un plasmablasto exhibe una proliferación más alta y niveles más altos de secreción de anticuerpos en comparación con una célula B de memoria, mientras que una célula plasmática secreta niveles altos de anticuerpos, pero no es capaz de proliferar. Estas tres etapas del desarrollo se caracterizan además por diferencias en los marcadores de superficie celular, como se muestra en la Tabla 1.

20 Con un método de la invención, ha sido posible regular la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos. Una vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos se define en la presente descripción como el intervalo de tiempo en donde una célula B y sus células progenie son capaces de replicarse mientras mantienen su capacidad de producir anticuerpos y/o de desarrollarse en una célula que produce un anticuerpo. La vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos se acorta, por ejemplo, al forzar el paso de una célula productora de anticuerpos a otra etapa de desarrollo. En una modalidad, la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos se acorta al forzar el paso de dicha célula a la diferenciación terminal. Esta se caracteriza por un incremento de la producción de anticuerpos y la detención del ciclo celular. Durante la diferenciación terminal, las células dejan de proliferar y eventualmente, mueren. Preferentemente, sin embargo, la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos se prolonga, lo que significa que dicha célula productora de anticuerpos no se diferenciará terminalmente, o lo hará solo después de un periodo de tiempo más largo en comparación con el mismo tipo de células productoras de anticuerpos que actualmente se usan- y continuarán proliferando *in vitro*. De acuerdo con la invención, es posible regular la cantidad del producto de expresión BCL6 y Bcl-xL en una célula productora de anticuerpos hasta tal punto que la célula productora de anticuerpos se lleva a y/o se mantiene en un estado de desarrollo predeterminado en el que las células siguen proliferando. Por lo tanto, con un método de la invención se ha hecho posible aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos, dado que es posible mantener una célula B en determinada etapa del desarrollo en donde se produce la replicación. En los presentes cultivos de células B *ex vivo*, la vida útil de replicación es sólo de unas pocas semanas a dos meses. Después de este tiempo, las células cultivadas pierden su capacidad para replicarse, su capacidad para producir anticuerpos y/o su capacidad para desarrollarse en una célula que produce anticuerpos. Con un método de acuerdo con la presente invención, sin embargo, se ha hecho posible prolongar la vida útil de replicación de las células productoras de anticuerpos, de manera que se generan cultivos *ex vivo* que comprenden células que son capaces de replicarse y producir anticuerpos (o desarrollarse en células que producen anticuerpos).

45 Una célula productora de anticuerpos se define como una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpos o una parte funcional, derivado y/o análogo de estos y/o cuya célula que es capaz de desarrollarse en una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpos o una parte funcional, derivado y/o análogo de estos. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos comprende una célula B y/o una célula plasmática derivada de una célula B. Una célula B se denomina, en la presente descripción, una célula productora de anticuerpos, incluso cuando la célula B está en un estado en donde la producción de anticuerpos es baja o no está presente en absoluto, tal como una célula B virgen o una célula B de memoria, activada o no, porque dichas células son capaces de desarrollarse en células que producen anticuerpos, tales como un plasmablasto y/o célula plasmática. Dicha célula productora de anticuerpos comprende, preferentemente, una célula de mamífero. Los ejemplos no limitantes incluyen células productoras de anticuerpos derivadas de un individuo humano, roedor, conejo, llama, cerdo, vaca, cabra, caballo, simio, gorila.

50 Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos comprende una célula humana, una célula murina, una célula de conejo y/o una célula de llama.

Una parte funcional de un anticuerpo se define como una parte que tiene, al menos, una propiedad igual que dicho anticuerpo en cuanto a clase, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional es preferentemente capaz de unirse a un mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma medida. Una parte funcional de un anticuerpo comprende, preferentemente, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo de una sola cadena y/o un fragmento Fab. Un derivado o análogo funcional de un anticuerpo se define como un anticuerpo que se ha alterado de manera que al menos una propiedad - preferentemente una propiedad de unión al antígeno - del compuesto resultante, es esencialmente la misma en cuanto a clase, no necesariamente en cantidad.

65 La BCL6 codifica un represor transcripcional que se requiere para el desarrollo de células B y células T normales y su

maduración, y que es necesario para la formación de centros germinales. (Ye, 1997). La BCL6 se expresa altamente en células B de centros germinales, mientras que apenas se expresa en células plasmáticas. La BCL6 inhibe la diferenciación de las células B activadas en células plasmáticas. La proteína-1 de maduración inducida por linfocitos B represores transcripcionales (Blimp-1) es necesaria para el desarrollo de una célula B en una célula plasmática. La variante humana de la Blimp-1 se denomina Prdm1. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a Blimp-1 incluye una referencia a Prdm1. Blimp-1 conduce la diferenciación celular. BCL6 y Blimp-1 reprimen la expresión del otro; por tanto, en una situación natural cuando una alcanza un nivel de expresión más alto que la otra, se fuerza la etapa de diferenciación. En el cuerpo humano, la diferenciación de las células plasmáticas a partir de células B vírgenes o activadas de memoria implica la regulación por disminución de BCL6 y la regulación por aumento de Blimp-1. En las células del centro germinal, la expresión de BCL6 es alta y la expresión de Blimp-1 es baja. En las células de memoria en reposo, la expresión de BCL6 y de Blimp-1 son bajas. Las señales que desencadenan la diferenciación producen una regulación por aumento de Blimp-1 y esta Blimp-1 contrarresta la expresión de BCL6. La etapa donde se expresan BCL6 y Blimp-1 es de corta duración y se llama plasmablast. Con niveles progresivamente crecientes de Blimp-1, la expresión de BCL6 se extingue, lo que resulta en una célula plasmática.

En un aspecto de un método BCL6 y Blimp-1 se coexpresan en una célula productora de anticuerpos (lo que significa que tanto BCL6 y Blimp-1 se expresan en una célula productora de anticuerpos), lo que resulta en una célula productora de anticuerpos que es capaz de proliferar cuando se proporciona una señal adecuada. Se ha encontrado que la coexpresión de BCL6 y Blimp-1 da como resultado una célula productora de anticuerpos que es capaz de proliferar y producir anticuerpos. BCL6 y Blimp-1 se coexpresan, preferentemente, en una célula B, preferentemente una célula B humana. La coexpresión de BCL6 y Blimp-1 en una célula B da como resultado la estabilización de dicha célula B en una etapa similar al plasmablasto. Los plasmablastos, como las células plasmáticas, son capaces de secretar anticuerpos. Sin embargo, los plasmablastos todavía son capaces de proliferar, mientras que las células plasmáticas han perdido su capacidad de proliferación. Por lo tanto, las células plasmáticas no son adecuadas para cultivar líneas de células productoras de anticuerpos. Aunque los plasmablastos ejercen características productoras de anticuerpos y de proliferación altamente favorables, todavía no se han usado para la producción de anticuerpos a largo plazo, ya que no ha sido posible estabilizar los plasmablastos hasta la presente invención.

Con un método de la invención, entre otras cosas, se ha podido, convertir una célula B virgen o una célula B de memoria en una célula de tipo plasmablasto y estabilizar dicha célula para que no se produzca su rápida diferenciación en una célula plasmática. Esto es lo contrario al desarrollo natural de las células plasmáticas, en donde la expresión de Blimp-1 en una célula B de memoria resulta en un desarrollo rápido en una célula plasmática, inhibiendo así la expresión de BCL6 de manera que la célula plasmática resultante apenas expresa BCL6. Un aspecto de la presente invención involucra entonces la coexpresión de BCL6 y de Blimp-1 en una célula B, lo que resulta en una célula que es capaz de proliferar y de producir anticuerpos. Preferentemente, se genera un cultivo estable de células B. Los cultivos *ex vivo* estables a largo plazo de células productoras de anticuerpos ahora son posibles. Estas células B productoras de anticuerpos que coexpresan BCL6 y Blimp-1 pueden estabilizarse además a través de la adición del gen antiapoptótico Bcl-xL. Con la introducción de Bcl-xL, ahora es posible cultivar plasmablastos en condiciones de baja densidad celular. Por lo tanto, la invención también proporciona un método para cultivar plasmablastos en condiciones de baja densidad celular, que comprende proporcionar una célula productora de anticuerpos con niveles de expresión de BCL6 y Bcl-xL con cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

De acuerdo con la invención, se proporciona una célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos. De esta forma, es posible regular una concentración de BCL6 en una célula productora de anticuerpos con independencia de la expresión de BCL6 endógena. Por lo tanto, aun cuando la expresión de BCL6 endógena sea baja o esté ausente, causado, por ejemplo, por Blimp-1, una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma sigue siendo capaz de producir una concentración de BCL6 que sea suficiente para influir sobre la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. Por lo tanto, un método de acuerdo con la invención comprende proporcionar dicha célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma.

Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos se proporciona con una secuencia de ácido nucleico constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma, de manera que la expresión de BCL6 se mantiene incluso cuando la expresión de BCL6 endógena de dicha célula es inhibida por un represor endógeno tal como Blimp-1. Más preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, es regulada por un inductor exógeno del represor, de manera que la extensión de la expresión de BCL6 se regula a voluntad. Por ejemplo, se usa un sistema promotor inducible tal como un sistema Tet-on o Tet-off.

Se describe un método en donde la cantidad de BCL6 se regula indirectamente al proporcionar una célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica E47 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. E47 codifica un factor de transcripción que pertenece a una familia de proteínas hélice-lazo-hélice, denominadas proteínas E. Existen cuatro proteínas E, E12, E47, E2-2 y HEB, que participan en el desarrollo de linfocitos. E12 y E47 están codificadas por un gen denominado E2A, que se corta y empalma de forma diferente. Las proteínas E pueden ser inhibidas por el inhibidor de proteínas Id2 e Id3, y ABF-1 (Mathas S., 2006). Las proteínas E se han descrito como

supresores tumorales y han mostrado que su sobreexpresión induce la apoptosis. Uno de los objetivos específicos de E47 son los genes Socs1 y Socs3. Estos genes Socs se conocen como reguladores negativos de STAT5b y, por consiguiente, indirectamente de BCL6. En otras palabras, la expresión de E47 en una célula B potencia la expresión de Blimp-1, lo que resulta en la diferenciación de las células B hacia un fenotipo productor de anticuerpos (célula plasmática).

La cantidad de expresión de Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos puede ser regulada de varias formas. Una célula productora de anticuerpos puede proporcionarse con un compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1. Adicionalmente, o alternativamente, una célula productora de anticuerpos se cultiva en presencia de un compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1. Por lo tanto, se describe adicionalmente un método que comprende proporcionar dicha célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1. Se describe adicionalmente un método que comprende cultivar dicha célula productora de anticuerpos en presencia de un compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1. Preferentemente, se usa un compuesto que es capaz de potenciar la expresión de Blimp-1 para contrarrestar la regulación por disminución de Blimp-1 durante la expresión de BCL6. Dicho compuesto comprende, más preferentemente, IL21.

Un compuesto preferido capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1 comprende una proteína transdutora de señales de activación y transcripción 3 (STAT3) o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta y/o una secuencia de ácido nucleico que la codifica. STAT3 es un transductor de la señal que participa en el desarrollo y la diferenciación de células B. STAT3 es capaz de regular por aumento la expresión de Blimp-1. Por lo tanto, se describe además un método en donde dicho compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1 comprende STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, o una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3, o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. Con mayor preferencia, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta es regulada por un inductor exógeno del represor, de manera que la extensión de la expresión de STAT3 se regula a voluntad. Por ejemplo, se usa un sistema promotor inducible tal como, por ejemplo, un sistema Tet-on o Tet-off. En una modalidad, una proteína de fusión que comprende STAT3, un derivado o análogo, y ER se introduce en dicha célula, lo que permite la regulación de la expresión de STAT3 por el hidroxitamoxifeno.

Debido a que STAT3 es capaz de influir sobre la expresión de Blimp-1, también es posible regular indirectamente la expresión de Blimp-1 administrando un compuesto capaz de regular de forma directa o indirectamente la actividad y/o la expresión de STAT3. Puede proporcionarse una célula productora de anticuerpos con un compuesto que es capaz de potenciar la actividad de STAT3, de manera que también se potencia indirectamente la expresión de Blimp-1. Además, se describe un método en donde se proporciona una célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la actividad de STAT3.

Por lo tanto, puede proporcionarse una célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de activar directa o indirectamente STAT3 para potenciar la expresión de Blimp-1.

STAT3 se activa de varias formas. Preferentemente, STAT3 se activa al proporcionar una célula productora de anticuerpos con una citocina. Las citocinas, estando implicadas de forma natural en la diferenciación de las células B, son muy eficaces en la regulación de las proteínas STAT. Activadores muy eficaces de STAT3 son IL-21 e IL-6, aunque se sabe que IL-2, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-27 también activan el STAT3. Además, los receptores de tipo Toll (TLR), que están implicados en la inmunidad innata, también son capaces de activar el STAT3. Se divulga un método en donde dicho compuesto capaz de influir directa o indirectamente sobre la expresión de Blimp-1, comprende IL-21, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15 y/o IL-27. Más preferentemente, se usa IL-21, ya que la IL-21 es particularmente adecuada para influir sobre la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. La IL-21 es capaz de regular por aumento la expresión de Blimp-1, incluso cuando la expresión de Blimp-1 es contrarrestada por BCL6.

Adicionalmente o alternativamente se usa una quinasa Janus (JAK) mutada para activar el STAT3.

De forma natural, una JAK es capaz de fosforilar STAT3 después de que ha sido activada por al menos una citocina. Una quinasa Janus mutada capaz de activar STAT3, independiente de la presencia de citocinas, es particularmente adecuada en un método de acuerdo con la presente invención.

Como ya se explicó antes, un compuesto capaz de potenciar la expresión de Blimp-1 puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. La presencia de una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta permite una presencia continua de STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de este, incluso cuando la expresión de STAT3 endógena es muy baja o está ausente.

También es posible disminuir la expresión y/o la actividad de STAT5 para regular por aumento Blimp-1. Si la cantidad y/o la actividad de STAT5 disminuye, la activación de la expresión de BCL6 también disminuye, lo que resulta en una cantidad menor del producto de expresión BCL6. Ya que BCL6 y Blimp-1 contrarrestan la expresión entre sí, una cantidad menor del producto de expresión BCL6 resulta en una cantidad mayor del producto de expresión Blimp-1. Los

compuestos capaces de regular por disminución la actividad de STAT5 son capaces de regular por aumento indirectamente Blimp-1. Dichos compuestos, por ejemplo, comprenden miembros del supresor de las proteínas de señalización de citocinas (SOCS). La cantidad del producto de expresión Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos puede por lo tanto regular por aumento al proporcionar dicha célula con una proteína SOCS y/o mediante la activación de una proteína SOCS dentro de dicha célula.

En un aspecto, la expresión y/o actividad de STAT5 disminuye cuando dicha célula productora de anticuerpos se proporciona con una secuencia de ácido nucleico que codifica E47 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. Por lo tanto, la expresión de E47 en las células B que expresan niveles altos de STAT5b interviene con diferenciación y proliferación, es decir, el bloqueo de STAT5 a través de E47 y SOCS resulta en una disminución de los niveles de BCL6 y posteriormente en un aumento de los niveles de Blimp-1. Los niveles regulados por aumento de Blimp-1 resultan en una disminución de la proliferación y en una diferenciación de la célula implicada hacia una célula productora de anticuerpos. En otras palabras, la expresión de E47 en una célula B potencia la expresión de Blimp-1, lo que resulta en la diferenciación de las células B hacia un fenotipo productor de anticuerpos (célula plasmática).

Por al menos una parte funcional de una proteína STAT3 y/o BCL6 se entiende una molécula proteica que tiene la misma capacidad - en cuanto a la clase, no necesariamente en cantidad - de influir sobre la estabilidad de una célula protectora de anticuerpos en comparación con una proteína STAT3 y/o BCL6, respectivamente. Una parte funcional de una proteína STAT3 está, por ejemplo, desprovista de aminoácidos que no están implicados, o lo están muy poco, en dicha capacidad. Un derivado de una proteína STAT3 y/o BCL6 se define como una proteína que se ha alterado de manera que la capacidad de dicha proteína para influir sobre la estabilidad de una célula productora de anticuerpos es esencialmente la misma en cuanto a clase, no necesariamente en cantidad. Se proporciona un derivado de muchas formas, por ejemplo, a través de la sustitución conservadora de aminoácidos en donde un aminoácido se sustituye por otro aminoácido con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad etc.), de manera que es probable que el funcionamiento general no resulte seriamente afectado. Por ejemplo, un derivado comprende una proteína de fusión, tal como una proteína de fusión STAT5-ER cuya actividad depende de la presencia de 4-hidroxitamoxifeno (4HT). Un análogo de una STAT3 y/o BCL6 se define como una molécula que tiene la misma capacidad de influir sobre la estabilidad de una célula productora de anticuerpos en cuanto a clase, no necesariamente en cantidad. Dicho análogo no se deriva necesariamente de dicha proteína STAT3 y/o BCL6.

Una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde dicha célula productora de anticuerpos se proporciona con un agente de inmortalización adicional, preferentemente un agente transformante, tal como EBV. Con un agente de inmortalización adicional, se potencia la estabilidad, proliferación y/o producción de anticuerpos de una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención. Un agente transformante es un agente capaz de modificar al menos parte del genoma de una célula. Dicho agente transformante comprende, preferentemente, ácido nucleico capaz de incorporarse en el genoma de una célula.

En una modalidad preferida, una célula productora de anticuerpos, preferentemente una célula B, se proporciona con el virus de Epstein-Barr (EBV). La infección de una célula productora de anticuerpos de la invención con EBV resulta en un incremento de la estabilidad, proliferación y/o producción de anticuerpos de dicha célula. En una modalidad particularmente preferida, una célula productora de anticuerpos, preferentemente una célula B, se cultiva en presencia de IL-21 y se proporciona con EBV. Esto da como resultado una mejora de la proliferación y/o de la producción de anticuerpos en comparación con el mismo tipo de células productoras de anticuerpos sin IL-21 y/o EBV. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos se cultiva en presencia de IL-21 antes de infectarse con EBV. Por lo tanto, se proporciona un método para aumentar la estabilidad de una célula productora de anticuerpos, que comprende cultivar dicha célula en presencia de IL-21 y proporcionar dicha célula con EBV.

De acuerdo con la presente invención, la IL-21 es particularmente adecuada para mejorar la estabilidad de una célula de anticuerpos. Las modalidades preferidas comprenden cultivar células productoras de anticuerpos, preferentemente células B, en presencia de IL-21, cuyas células productoras de anticuerpos están provistas, además, con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma, y con una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL. Dicha célula productora de anticuerpos se infecta preferentemente con EBV. Por ejemplo, una célula productora de anticuerpos que está infectada naturalmente con EBV se usa en un método de acuerdo con la invención. Alternativamente o adicionalmente, se proporciona una célula productora de anticuerpos con EBV.

En una modalidad preferida, dicha célula productora de anticuerpos se cultiva en presencia de IL-21 antes de que dicha célula productora de anticuerpos se proporcione con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma. Se prefiere cultivar células productoras de anticuerpos, preferentemente células B, en presencia de IL-21 antes de influir sobre la cantidad del producto de expresión BCL6 dentro de dicha célula, debido a que en estas modalidades la estabilidad, la proliferación y/o la producción de anticuerpos se mejora particularmente bien.

La invención proporciona un método para influir sobre la estabilidad de una célula productora de anticuerpos como en la presente descripción, que comprende aumentar directamente la cantidad del producto de expresión Bcl-xL dentro de dicha célula productora de anticuerpos. Esto se logra al proveer dicha célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL.

Bcl-xL es un miembro de la familia antiapoptótica de Bcl-2, las proteínas Bcl2 interaccionan con, y contrarrestan, los denominados miembros de la familia que solo tienen el dominio de homología 3 (BH3) de Bcl-2, tales como Bax, Bak, Bim, y Bad, que inducen la liberación del citocromo c seguido de estímulos de muerte intrínsecos (Boise, L. H., 1993). Así, la protección de la integridad de la membrana mitocondrial a través de proteínas como Bcl-xL es crucial para la supervivencia celular.

La activación de STAT5 ha mostrado que protege a las células de la muerte celular. STAT5 ha mostrado que regula la expresión de Bcl-xL, apoyando un papel anti-apoptótico para STAT5. STAT5 regula positivamente la expresión de Bcl-xL a través de elementos de unión a STAT dentro del promotor de Bcl-xL. In vivo, la expresión de Bcl-xL está ausente en la médula ósea de ratones doblemente deficientes en STAT5A/B. Además, la supervivencia de los eritroblastos mediada por STAT5 depende de la regulación con aumento de Bcl-xL. Recientemente, la sobreexpresión transgénica de Bcl-xL en células B de ratón ha mostrado que promueve la supervivencia de las células B y los focos de células plasmáticas no malignas.

Un método de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para producir un cultivo de células productoras de anticuerpos que comprende células productoras de anticuerpos que son capaces de proliferar y secretar anticuerpos. En una modalidad, se usa una célula B de memoria para producir un cultivo de células B *ex vivo*. Alternativamente o adicionalmente, se usa una célula B virgen. Dicha célula B de memoria y/o célula B virgen es, preferentemente, humana, de manera que se producen anticuerpos humanos. Preferentemente, se usa una célula B de memoria con una especificidad deseada. Esto significa que se usa una célula B de memoria que es capaz de desarrollarse en una célula secretora de anticuerpos, donde los anticuerpos tienen una especificidad deseada contra un antígeno de interés. Dicho antígeno de interés comprende, por ejemplo, un antígeno derivado de patógenos, un antígeno derivado de tumor y/o un autoantígeno. En una modalidad, las células B se aíslan de una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre de cordón umbilical y/o una muestra de amígdala, usando métodos conocidos en la técnica. Las células B de memoria, por ejemplo, se aíslan mediante la selección del marcador de células B CD19 y la (posterior) selección por IgG y/o CD27 de superficie celular. En una célula B del centro germinal, la expresión de BCL6 es alta mientras que la expresión de Blimp-1 es baja. El desarrollo natural en una célula secretora de anticuerpos implica la regulación por aumento de la expresión de Blimp-1. Ya que Blimp-1 reprime la expresión de BCL6, la regulación por aumento de Blimp-1 resulta en la regulación por disminución de BCL6 en una situación natural. En una modalidad preferida de la presente invención, sin embargo, la expresión de Blimp-1 se regula por aumento mientras que la expresión de BCL6 se mantiene, al menos en parte. Esto resulta en una célula productora de anticuerpos, en donde BCL6 y Blimp-1 se coexpresan. Dicha célula productora de anticuerpos es capaz de proliferar y secretar anticuerpos y, por tanto, es adecuada para usar en un cultivo de células B *ex vivo*. Dicha célula productora de anticuerpos se protege por apoptosis por Bcl-xL. Dicha célula productora de anticuerpos se infecta preferentemente con EBV. En una modalidad, se usa una célula productora de anticuerpos infectada de forma natural con EBV. Alternativamente, o adicionalmente, una célula productora de anticuerpos se proporciona con EBV. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la presente invención proporciona la ventaja de que es estable y no sufre diferenciación terminal durante un periodo prolongado. Dicha célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención es estable por al menos una semana, preferentemente por al menos un mes, más preferentemente por al menos tres meses, lo más preferentemente por al menos seis meses. Una célula B de acuerdo con la invención se cultiva preferentemente en presencia de CD40L, ya que la replicación de la mayoría de las células B se favorece por CD40L.

En una modalidad, la expresión de BCL6 se mantiene esencialmente al mismo nivel, o a un nivel más alto, en comparación con una célula B del centro germinal ya que una expresión significativa de BCL6, junto con la expresión de Blimp-1, resulta en una célula productora de anticuerpos con propiedades de producción de anticuerpos y proliferación y/o estabilidad preferidas. Dicha expresión de BCL6 se acompaña de la expresión de Bcl-xL, lo que resulta en propiedades de proliferación y de producción de anticuerpos y/o estabilidad todavía más preferidas.

Por lo tanto, una modalidad proporciona un método para producir una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses. También se proporciona un método *ex vivo* para producir una célula productora de anticuerpos que comprende aumentar un nivel de expresión de Blimp-1 en una célula B de memoria o una célula B virgen y aumentar y/o mantener un nivel de expresión de BCL6 en dicha célula. Preferentemente, dichos niveles de expresión de BCL6 y Blimp-1 se llevan a, y/o se mantienen en, esencialmente el mismo nivel, o en un nivel superior, en comparación con un plasmablasto. En una modalidad, dicha célula B se infecta con EBV (natural y/o artificialmente) y/o se transduce con Bcl-xL. Más preferentemente, se usa una célula B de memoria. Dicha célula B de memoria tiene, preferentemente, una especificidad por un antígeno derivado de patógenos, un antígeno derivado de tumor y/o un autoantígeno.

La expresión de Blimp-1 y la expresión de BCL6 están influenciadas de varias formas, como ya se ha descrito anteriormente en la presente descripción. Por ejemplo, la expresión de Blimp-1 se potencia en una célula B de memoria y/o una célula B virgen proporcionando a dicha célula B capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de Blimp-1, tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica Blimp-1 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta.

Preferentemente, la expresión de dicho ácido nucleico está regulada por un inductor exógeno del represor, de manera que la extensión de Blimp-1 se regula a voluntad.

Alternativamente, o adicionalmente, una célula B de memoria y/o una célula B virgen se cultiva en presencia de un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de Blimp-1, tal como, por ejemplo, IL-21, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IL-27, o una quinasa Janus mutada. Preferentemente, la IL-21 se usa porque esta citocina es particularmente adecuada para potenciar la expresión de Blimp-1 y estabilizar una célula productora de anticuerpos con un método de acuerdo con la presente invención. En una modalidad, se proporciona una célula B con una proteína SOCS o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, ya que una proteína SOCS o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta es capaz de potenciar indirectamente la expresión de Blimp-1. En otra modalidad alternativa o adicional, se proporciona una célula B con E47 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, o un ácido nucleico que codifica la misma. Como ya se indicó anteriormente, como un resultado de un mayor nivel de E47 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta, la función de la proteína SOCS se potencia y la expresión de Blimp-1 aumenta indirectamente. La expresión de Blimp-1 resulta en la regulación por disminución de BCL6 endógena. Por lo tanto, dicha célula B de memoria también se proporciona con un compuesto capaz de mantener la expresión de BCL6, que resulta en la coexpresión de BCL6 y Blimp-1. Dicho compuesto es capaz, preferentemente, de inducir y/o mantener la expresión de BCL6 esencialmente al mismo nivel o a un nivel mayor en comparación con un plasmablasto. Un ejemplo preferido de dicho compuesto es una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta.

Es posible proporcionar directamente una célula B con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6, por ejemplo, mediante transducción con una secuencia de ácido nucleico. En una modalidad, la expresión de BCL6 en una célula B se mantiene y/o potencia cultivando una célula B de memoria en presencia de un compuesto que es capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6 y/o que es capaz de mantener la expresión de BCL6 a esencialmente el mismo nivel, o a un nivel mayor, en comparación con una célula B del centro germinal.

En una modalidad preferida, la expresión de Blimp-1 se regula por aumento en una célula B, preferentemente cultivando dicha célula B en presencia de un compuesto capaz de activar STAT3 y/o Blimp-1. Dicho compuesto comprende, preferentemente, IL-21. Dicha célula B comprende, preferentemente, una célula B de memoria. Después de esto, la expresión de BCL6 se potencia, preferentemente. Se ha mostrado que la regulación por aumento de Blimp-1 en una primera etapa, seguida de la regulación por aumento de BCL6 resulta en células B particularmente estables capaces de replicarse y producir anticuerpos. En una modalidad de la invención, la expresión de Blimp-1 es todavía regulada por aumento, mientras que la expresión de BCL6 se potencia. Alternativamente, sin embargo, la expresión de Blimp-1 no se regula por aumento, mientras que la expresión de BCL6 se potencia. De este modo, la capacidad de replicación de una célula B está particularmente potenciada. Por lo tanto, una capacidad productora de anticuerpos de una célula B se potencia, preferentemente, en primer lugar, por regulación por aumento de la expresión y/o la actividad de Blimp-1. Posteriormente, una capacidad de replicación de dicha célula B se potencia, preferentemente, por regulación por aumento de la expresión y/o la actividad de BCL6. La célula B se cultiva, preferentemente, en presencia de un compuesto capaz de potenciar la expresión de Blimp-1 y/o la actividad, hasta que la replicación aumenta significativamente. Posteriormente, dicha célula B se cultiva, preferentemente, de nuevo en presencia de un potenciador de la expresión y/o la actividad de Blimp-1, de manera que se mantiene la producción de anticuerpos. Como se muestra en los ejemplos, es posible regular Blimp-1 y BCL6 de varias formas, lo que resulta en la coexpresión de Blimp-1 y BCL6 en una célula B, en donde la célula B es capaz de replicarse y producir anticuerpos. En una modalidad preferida, dicha célula B se transduce con Bcl-xL y se infecta con EBV (natural y/o artificialmente).

La expresión de Blimp-1 puede ser regulada por aumento en una célula B, preferentemente una célula B de memoria, mediante el cultivo de dicha célula B en presencia de un compuesto capaz de activar la STAT3. Dicho compuesto comprende, preferentemente, IL-21. De acuerdo con una modalidad, dicha célula B se proporciona con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma. Dichas células B se cultivan preferentemente durante unos pocos días en ausencia de dicho compuesto capaz de activar STAT3 para potenciar la replicación. Posteriormente, dichas células se cultivan de nuevo preferentemente con - y/o se proporcionan con - un compuesto capaz de activar la STAT3.

En los Ejemplos, se muestra una modalidad particularmente preferida, en donde las células B se cultivan primero en presencia de IL-21. Posteriormente, las células B se proporcionan con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6. Las células B se cultivan en ausencia de IL-21 y en presencia de IL-2 e IL-4 durante unos pocos días para permitir la expresión de BCL6, después de lo cual se administra IL-21 de nuevo al cultivo para potenciar la replicación y la producción de anticuerpos. Se obtienen células B, en donde BCL6 y Blimp-1 se coexpresan, donde las células B son capaces de replicarse y producir anticuerpos en un cultivo *ex vivo* durante al menos 6 meses. En una modalidad preferida, dichas células B se infectan con EBV. Se prefiere un cultivo de células B de acuerdo con la invención, ya que las células B son capaces de replicarse y producir anticuerpos en un cultivo *ex vivo* durante un periodo de tiempo más largo en comparación con los cultivos de células B actuales.

Los intentos de la técnica anterior para usar STAT5 para obtener un cultivo de células B estable capaz de producir anticuerpos, tales como los descritos en el documento WO 03/052083, fallaron porque las células B pierden su

capacidad de desarrollarse en células productoras de anticuerpos en 2 meses. Sin embargo, la presente invención proporciona la idea de que STAT5 es de hecho adecuado para producir un cultivo de células B productor de anticuerpos estable si la expresión de Blimp-1 también se regula positivamente en las células B.

5 Por lo tanto, un método de la invención permite una regulación sutil de la capacidad de replicación y la capacidad de producción de anticuerpos de las células B cultivadas *ex vivo*. Cuando se desea la regulación por aumento de la producción de anticuerpos, se favorece la expresión de Blimp-1 sobre la expresión de BCL6. Cuando se desea regulación por aumento de la replicación, se favorece la expresión de BCL6 sobre la expresión de Blimp-1. Un método descrito en la presente descripción permite el mantenimiento de un equilibrio en donde BCL6 y Blimp-1 se coexpresan, lo que resulta en células productoras de anticuerpos que son capaces de replicarse y producir anticuerpos *ex vivo*. En una modalidad, dichas células B se infectan con EBV después de establecido el equilibrio, para aumentar adicionalmente y estabilizar la producción de anticuerpos.

15 La invención describe, además, la estabilización del crecimiento de las células productoras de anticuerpos con Bcl-xL.

Si se usa una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 y Bcl-xL, o una parte funcional de BCL6 y Bcl-xL, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico está regulada, preferentemente, por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno. De este modo, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico se regula por determinación de la cantidad de compuesto exógeno que se administra.

20 En una modalidad preferida adicional, se proporciona a una célula productora de anticuerpos con un agente de inmortalización para aumentar la estabilidad, proliferación y/o producción de anticuerpos de dicha célula. Como ya se explicó anteriormente, dicho agente de inmortalización comprende, preferentemente, un agente transformante. En una modalidad particularmente preferida, una célula B se infecta con EBV. Dicha célula B se cultiva, preferentemente, en presencia de IL-21. Como se muestra en los Ejemplos, las células B infectadas con EBV y cultivadas en presencia de IL-21 muestran una fuerte proliferación y una producción de anticuerpos potenciada. Dichas células B se cultivan preferentemente en presencia de IL-21 antes de infectarse con EBV. Sin embargo, también es posible aislar células B infectadas con EBV, preferentemente células B infectadas naturalmente con EBV y cultivarlas en presencia de IL-21. También se describe un método para influir sobre la estabilidad de una célula B, que comprende cultivar dicha célula B en presencia de IL-21 e infectar dicha célula B con EBV. Se proporciona también un método para influir sobre la estabilidad de una célula B infectada con EBV, que comprende cultivar dicha célula B infectada con EBV en presencia de IL-21. En una modalidad, se cultiva una célula B en presencia de IL-21, se infectada con EBV y posteriormente se cultiva en ausencia de IL-21.

35 Se puede analizar una pluralidad de células B para determinar la especificidad de un antígeno dado. Esto se realiza usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, un ELISA. Posteriormente, se selecciona al menos una célula B con una especificidad por un antígeno dado. Esto se realiza, por ejemplo, incubando células B con un antígeno marcado y aislando dichas células B usando métodos conocidos en la técnica. Las células B seleccionadas se cultivan, preferentemente, en presencia de IL-21. Las células seleccionadas se proporcionan con BCL6 exógeno, o una parte funcional de este, para inducir, mantener y/o mejorar la presencia y/o la cantidad de producto de expresión BCL6. At least one B cell comprising exogenous BCL6, is subsequently selected. Dicha célula B seleccionada se infecta con el virus de Epstein-Barr. Esta modalidad es particularmente adecuada para seleccionar y cultivar células B con una especificidad dada que derivan de un grupo de células B. Por ejemplo, las células B humanas se recolectan mediante selección por CD19, que es un marcador de células B, y se incuban con un antígeno de interés. De este modo, se seleccionan células B humanas con una especificidad deseada y se cultivan después *ex vivo*. Dichas células B se cultivan preferentemente en presencia de IL-21 en al menos una etapa del período de cultivo. En una modalidad preferida, dicha célula B se cultiva en presencia de IL-21 antes de introducir en dicha célula B BCL6, o una parte funcional de la misma. Dicha célula B se proporciona además con Bcl-xL.

50 Aunque el EBV promueve la proliferación y producción de anticuerpos, la infección con EBV de una célula productora de anticuerpos no siempre se prefiere. Por ejemplo, si se desea un control estricto de las propiedades y características genéricas de una célula productora de anticuerpos, se puede elegir no usar la infección por EBV porque la infección por EBV implica incorporación de secuencias de ácido nucleico desconocidas en el genoma de una célula. Además, una célula B infectada con EBV pierde su expresión en superficie del receptor de células B (BCR). Esto puede no ser deseado, por ejemplo, cuando las células B están destinadas a aislarse y/o seleccionarse para una especificidad deseada después de un largo período de cultivo. Dicho método de aislamiento y/o detección usualmente implica la unión de células B con una especificidad deseada a un antígeno de interés con su BCR. Por lo tanto, las células B infectadas con EBV con una expresión de BCR significativamente reducida son menos adecuados para dichos métodos de aislamiento/detección. Por consiguiente, en los casos en los que se desea la presencia de un receptor de células B sobre las células B, tal como, por ejemplo, en ensayos de detección, preferentemente, las células B no se infectan con EBV, o lo hacen en una etapa posterior.

65 Una modalidad proporciona un método de acuerdo con la invención que comprende además seleccionar y/o aislar un anticuerpo o una parte funcional, derivado y/o análogo de interés. En una modalidad se seleccionan y/o se aíslan células productoras de IgM y células productoras de IgG. Preferentemente, se selecciona y/o se aísla una célula productora de IgG.

Las células productoras de anticuerpos generadas con un método de acuerdo con la invención son adecuadas para producir anticuerpos contra un antígeno de interés. Sin embargo, en una modalidad preferida, los genes que codifican las cadenas pesada y/o ligera de Ig se aíslan de dicha célula y se expresan en una segunda célula, tal como, por ejemplo, células de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Dicha segunda célula, también denominada en la presente descripción una célula productora, se adapta, preferentemente, para la producción de anticuerpos comerciales. La proliferación de dichas células productoras resulta en una línea celular productora capaz de producir anticuerpos. Preferentemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir compuestos para usar en seres humanos. Por lo tanto, dicha línea celular productora está preferentemente libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos.

Preferentemente, se usa un método de acuerdo con la invención para generar una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente durante al menos tres meses, lo más preferentemente durante al menos seis meses, de manera que la producción de anticuerpos comerciales se ha hecho posible. Una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde se produce una célula productora de anticuerpos que es capaz de producir anticuerpos contra un antígeno de interés. Dicho antígeno de interés comprende preferentemente un antígeno derivado de patógenos, un antígeno derivado de tumor y/o un autoantígeno. Más preferentemente, se produce una línea celular estable capaz de producir anticuerpos monoclonales. Esto se realiza, preferentemente, usando células B de memoria que se han aislado, por ejemplo, de una muestra mediante selección por CD19 (marcador de células B) e IgG de superficie celular y/o CD27 (para marcar células de memoria). Además, una célula productora de anticuerpos capaz de unirse específicamente a un antígeno de interés se selecciona, por ejemplo, en un ensayo de unión usando dicho antígeno de interés. Posteriormente, de acuerdo con esta modalidad preferida, Blimp-1 y BCL6 se coexpresan en dicha célula productora de anticuerpos, lo que resulta en un cultivo de células capaz de unirse específicamente a dicho antígeno de interés. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos se infecta con EBV. Dicha célula B se proporciona además con Bcl-xL.

Si se usa solamente una célula de memoria se obtiene una línea celular de acuerdo con la invención que produce anticuerpos monoclonales. También es posible generar una línea celular productora de anticuerpos monoclonales a partir de varias células B capaces de producir anticuerpos contra diferentes antígenos. Después que se produce un cultivo de células B estables con un método de acuerdo con la invención, se aísla una célula B capaz de producir anticuerpos contra un antígeno de interés específico y al menos una parte funcional de un gen que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de Ig a partir de dicha célula B se expresa en una segunda línea celular. Preferentemente, al menos una parte funcional del gen que codifica la cadena pesada de Ig y al menos una parte funcional del gen que codifica la cadena ligera de Ig de dicha célula B se expresan en una segunda línea celular.

En una modalidad, una célula productora de anticuerpos, preferentemente, aunque no necesariamente una célula B de memoria, que se obtiene de un individuo expuesto previamente a un antígeno de interés, se usa en un método de acuerdo con la invención. De este modo, se hace posible producir anticuerpos humanos de interés *ex vivo*.

La invención proporciona además una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos nueve semanas, preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente durante al menos seis meses, que comprende:

- una secuencia de ácido nucleico exógena constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos, y
- una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica Bcl-xL o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos, lo que significa que una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la presente invención es capaz de replicar y producir anticuerpos o capaz de replicarse y desarrollarse en una célula que produce anticuerpos, durante dichos períodos de tiempo. Las células productoras de anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden, entre otras cosas, células productoras de IgM y células productoras de otros isotipos de inmunoglobulina como IgG, IgA, IgE. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención es particularmente adecuada para usar en una línea celular productora de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos de acuerdo con la invención se cultivan, preferentemente, *ex vivo* y los anticuerpos producidos por dichas células se recogen, preferentemente, para su uso posterior. Alternativamente, o adicionalmente, los genes que codifican los anticuerpos de dichas células se aíslan para su uso posterior. Los anticuerpos o partes funcionales, derivados y/o análogos de estos producidos con un método de acuerdo con la invención son útiles para una amplia variedad de aplicaciones, tales como, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas, profilácticas y diagnósticas, así como para fines de investigación y experimentos *ex vivo*. Por ejemplo, se realiza un ensayo de detección en donde los anticuerpos o partes funcionales, derivados y/o análogos de acuerdo con la invención se incuban con una muestra para determinar si está presente un antígeno de interés.

También se proporciona una célula productora de anticuerpos que comprende:

- un agente de immortalización, preferentemente un agente transformante, más preferentemente el virus de Epstein Barr; y

- una secuencia de ácido nucleico constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos y
- una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL.

5 Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención comprende, preferentemente, una célula de mamífero, más preferentemente una célula humana, una célula murina, una célula de conejo y/o una célula de llama. En una modalidad particularmente preferida, dicha célula productora de anticuerpos comprende una célula humana productora de anticuerpos humanos, porque los anticuerpos humanos son particularmente adecuados para aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas en individuos humanos.

10 En una modalidad, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6, STAT5, STAT3 y/o Bcl-xL y/o una parte funcional de BCL6, y Bcl-xL es constitutivamente activa, de manera que BCL6 o una parte funcional de la misma sigue estando presente en una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención, incluso cuando los genes de BCL6 y/o Bcl-xL endógenos se regulan por disminución por compuestos endógenos. Más preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 y/o Bcl-xL o una parte funcional de BCL6 y/o Bcl-xL es regulada por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno, de manera que la cantidad de BCL6 y/o Bcl-xL o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo se regula a voluntad mediante la regulación de la cantidad de compuesto exógeno que se administra. Por lo tanto, una modalidad proporciona una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención, en donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de BCL6 y/o Bcl-xL es regulada por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno.

25 Como se explicó anteriormente, en varias modalidades, las células productoras de anticuerpos de acuerdo con la presente invención se infectan con el EBV. Por lo tanto, la invención proporciona también una célula productora de anticuerpos que comprende:

- 1) un agente de immortalización, preferentemente un agente transformante, más preferentemente el virus de Epstein Barr; y
- 2) un compuesto que es capaz de influir directa o indirectamente en la cantidad del producto de expresión BCL6 en dicha célula y/o un compuesto que es capaz de influir directa o indirectamente en la cantidad del producto de expresión Blimp-1 en dicha célula. En una modalidad se proporciona una célula productora de anticuerpos con BCL6 y/o STAT5 y posteriormente se infecta con EBV. Por lo tanto, también se proporciona una célula productora de anticuerpos que comprende el virus de Epstein Barr y BCL6 exógena o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. También se proporciona una célula productora de anticuerpos que comprende el virus de Epstein Barr y STAT5 exógena o una parte funcional, derivado y/o análogo de esta. Dicha célula productora de anticuerpos es preferentemente una célula B. Como se demuestra en los ejemplos, las células B proporcionadas con BCL6/STAT5 y EBV muestran una proliferación y producción de anticuerpos particularmente fuertes.

40 Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la presente invención con una estabilidad mayor es particularmente adecuada para la producción de una línea celular *ex vivo*. Por lo tanto, la invención proporciona también un método para producir una línea celular productora de anticuerpos que comprende:

- obtener una célula productora de anticuerpos estable con un método de acuerdo con la invención, y
- cultivar dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*.

45 Preferentemente, se genera una línea de células B. Más preferentemente, se genera una línea celular estable que comprende células B capaces de producir anticuerpos dirigidos específicamente contra un antígeno de interés. Esto se realiza preferentemente obteniendo una célula B que es capaz de desarrollarse en una célula que produce anticuerpos contra un antígeno de interés, tal como, por ejemplo, un antígeno derivado de patógenos, un antígeno derivado de tumor y/o un autoantígeno. La cantidad de expresión de BCL6 y/o Blimp-1 en dicha célula se regula posteriormente. En una modalidad, dicha célula B está infectada con EBV. Dicha célula B se obtiene, preferentemente, a partir de un individuo que se ha expuesto a un antígeno de interés. Dicho individuo comprende, preferentemente, un mamífero, más preferentemente un individuo humano, un conejo, un roedor y/o una llama. En una modalidad particularmente preferida, dicho individuo es un individuo humano.

55 Por lo tanto, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, que comprende:

- obtener una célula B de un individuo, preferentemente un individuo humano, que se ha expuesto a un antígeno de interés,
- producir una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses, usando dicha célula B obtenida de dicho individuo en un método de acuerdo con la invención, y
- cultivar dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*.

Una aplicación importante es la producción de anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a un antígeno de interés. Por lo tanto, una modalidad de la invención proporciona un método para producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a un antígeno de interés, el método comprende:

- 5 - obtener una célula B capaz de diferenciarse en una célula B, de manera que la célula B produce anticuerpos capaces de unirse específicamente a dicho antígeno de interés,
- producir una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses, usando dicha célula B en un método de acuerdo con la invención, y
10 - obtener anticuerpos producidos por dicha célula productora de anticuerpos.

Dicha célula productora de anticuerpos se cultiva, además, preferentemente, *ex vivo* para proporcionar una línea celular estable capaz de producir anticuerpos específicamente dirigidos hacia un antígeno de interés. Más preferentemente, al menos una parte funcional de un gen que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de Ig de dicha célula B se expresa en una segunda línea celular. Dicha segunda célula se usa, preferentemente, para producir una línea celular comercialmente adecuada.

La invención se explica adicionalmente en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

20

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para aumentar la vida útil de replicación y/o la estabilidad de una célula productora de anticuerpos, que comprende
 - proporcionar dicha célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de una célula productora de anticuerpos; y
 - proporcionar dicha célula productora de anticuerpo con una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende proporcionar dicha célula productora de anticuerpos con un agente de inmortalización adicional.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente de inmortalización comprende un agente transformante.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde dicho agente de inmortalización comprende el virus de Epstein-Barr.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6, Bcl-xL o una parte funcional de BCL6 y/o Bcl-xL es regulada por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde la célula productora de anticuerpos que se cultiva es estable durante al menos una semana, preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha célula productora de anticuerpos es capaz de producir anticuerpos contra un antígeno de interés.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha célula productora de anticuerpos se ha obtenido de un individuo, donde el individuo se ha expuesto previamente a dicho antígeno de interés.
- 35 9. Un método para expresar un gen de una célula B que codifica la cadena pesada de Ig y/o la cadena ligera de Ig que comprende obtener un cultivo estable de células B con un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y expresar un gen de dicha célula B que codifica la cadena pesada de Ig y/o la cadena ligera de Ig en una segunda célula.
- 40 10. Una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos nueve semanas, preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente durante al menos seis meses, que comprende:
 - una secuencia de ácido nucleico exógena constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de la célula productora de anticuerpo, y
 - una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica Bcl-xL o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de la célula productora de anticuerpos.
- 45 11. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6, Bcl-xL, o una parte funcional de BCL6 y/o Bcl-xL es regulada por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno.
- 50 12. Una célula productora de anticuerpos que comprende:
 - un agente de inmortalización, preferentemente un agente transformante, más preferentemente el virus de Epstein Barr; y
 - una secuencia de ácido nucleico constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de la célula productora de anticuerpo y
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL.
- 55 13. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende el virus de Epstein Barr y BCL6 exógeno constitutivamente activo, o una parte funcional de la misma capaz de aumentar la vida útil de replicación de la célula productora de anticuerpos.
- 60 14. Un método para producir una línea de células B, que comprende:
 - obtener una célula productora de anticuerpos estable con un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y
- 65

- cultivar dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende:

- 5 - obtener una célula B de memoria y/o una célula B virgen a partir de un individuo que ha sido expuesto a un antígeno de interés,
- producir una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses, usando dicha célula B obtenida de dicho individuo en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y
10 - cultivar dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*.

16. Un método para obtener anticuerpos, que comprende:

- 15 - obtener una célula productora de anticuerpos estable con un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
- cultivar dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*, y
- cosechar los anticuerpos producidos por dicha célula productora de anticuerpos.

20 17. Un método para producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a un antígeno de interés, el método comprende:

- 25 - obtener una célula B de memoria y/o una célula B virgen capaz de diferenciarse en una célula B, donde la célula B produce anticuerpos capaces de unirse específicamente a dicho antígeno de interés,
- producir una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses, usando dicha célula B en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y
- obtener anticuerpos producidos por dicha célula productora de anticuerpos.

30 18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende cultivar adicionalmente dicha célula productora de anticuerpos *ex vivo*.

Figura 1

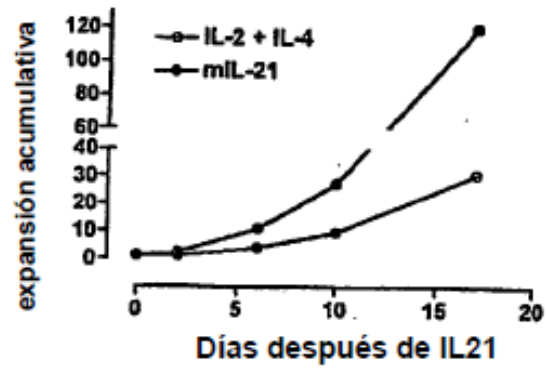


Figura 2

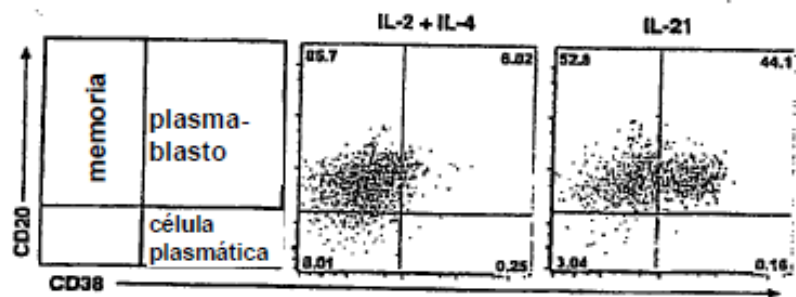


Figura 3

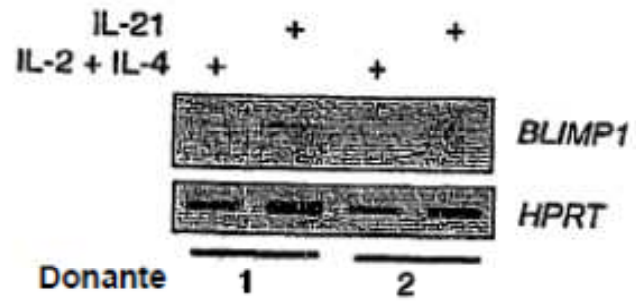
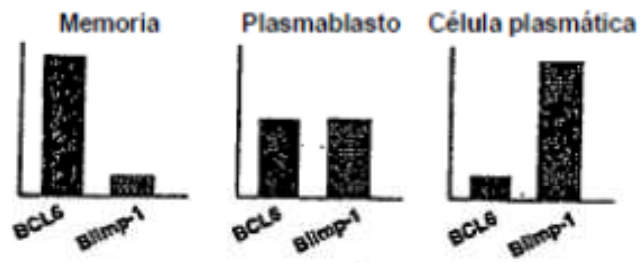


Figura 4

Diferenciación normal



Diferenciación en células BCL6⁻

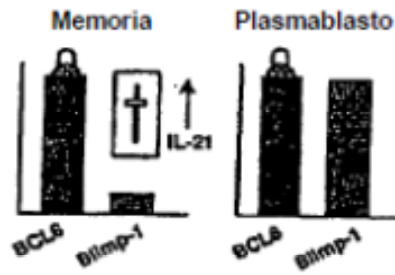


Figura 5

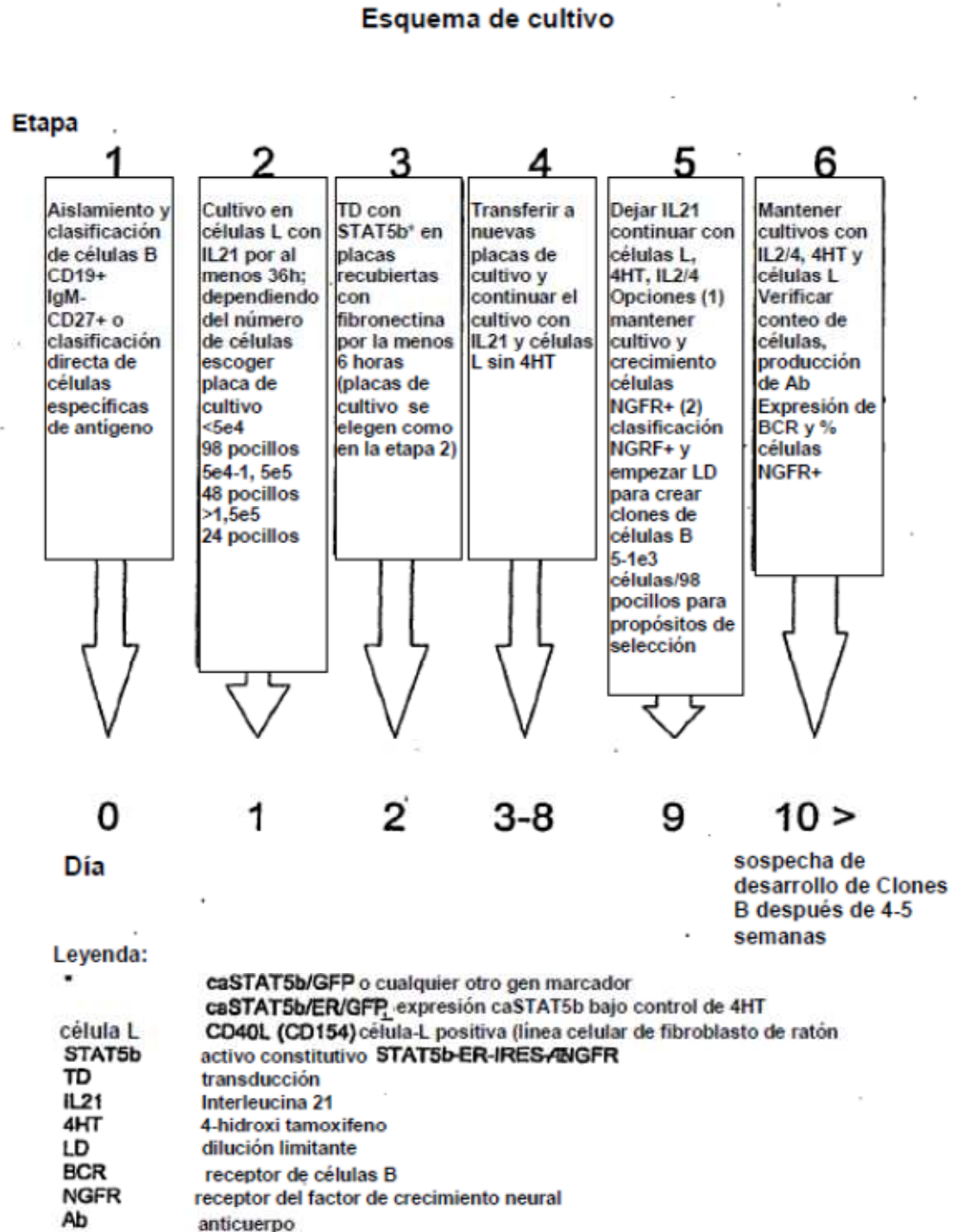


Figura 6a

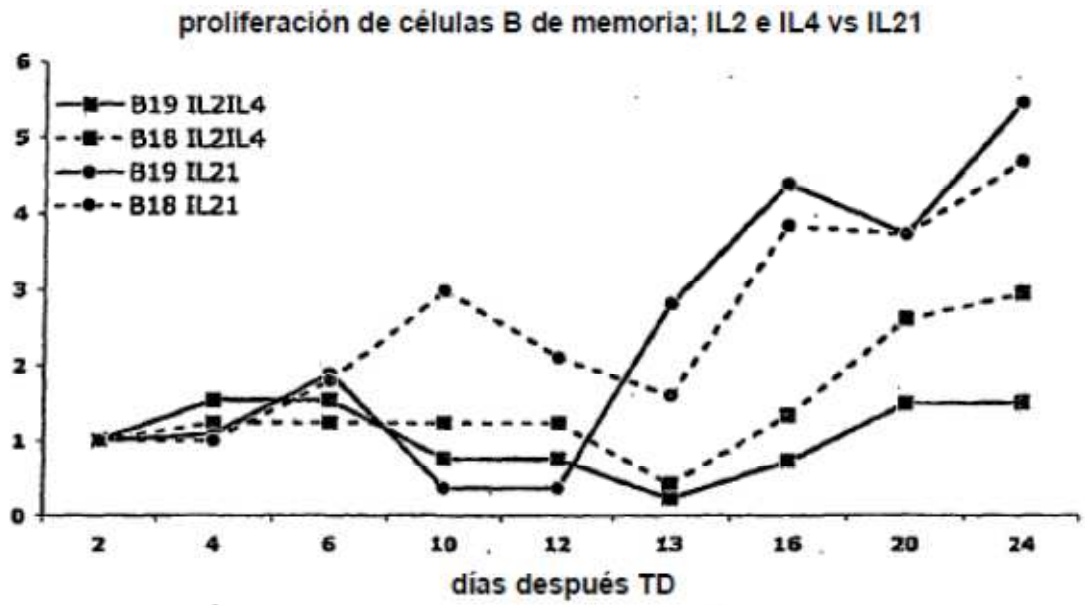


Figura 6b

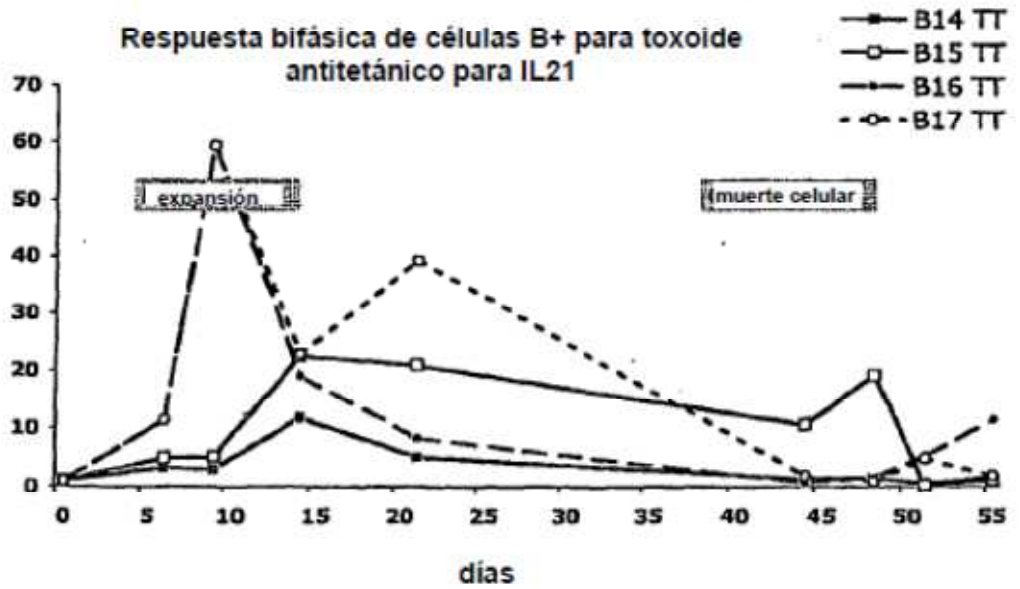


Figura 7

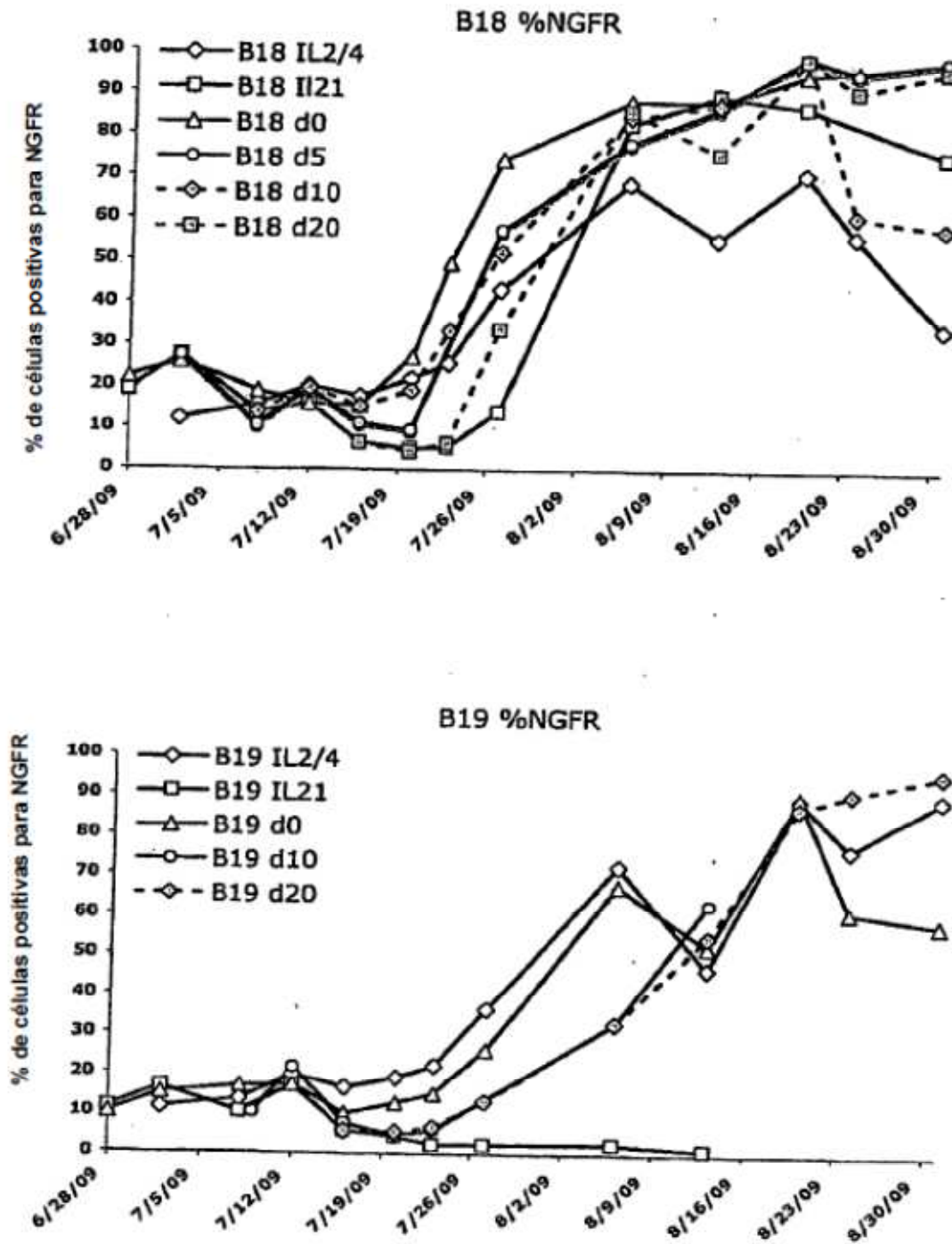


Figura 8a

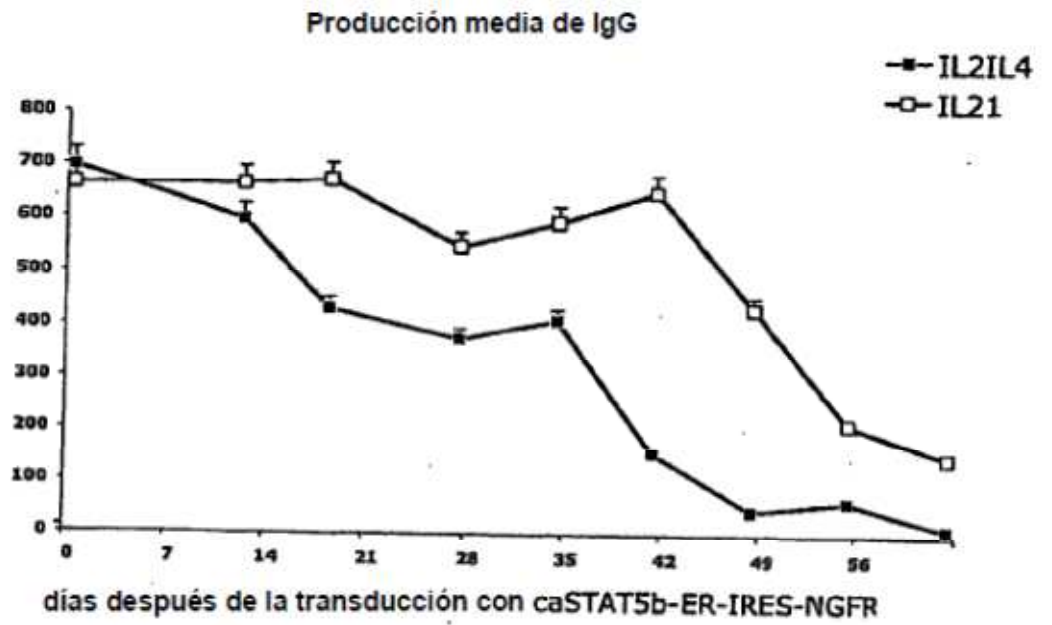


Figura 8b

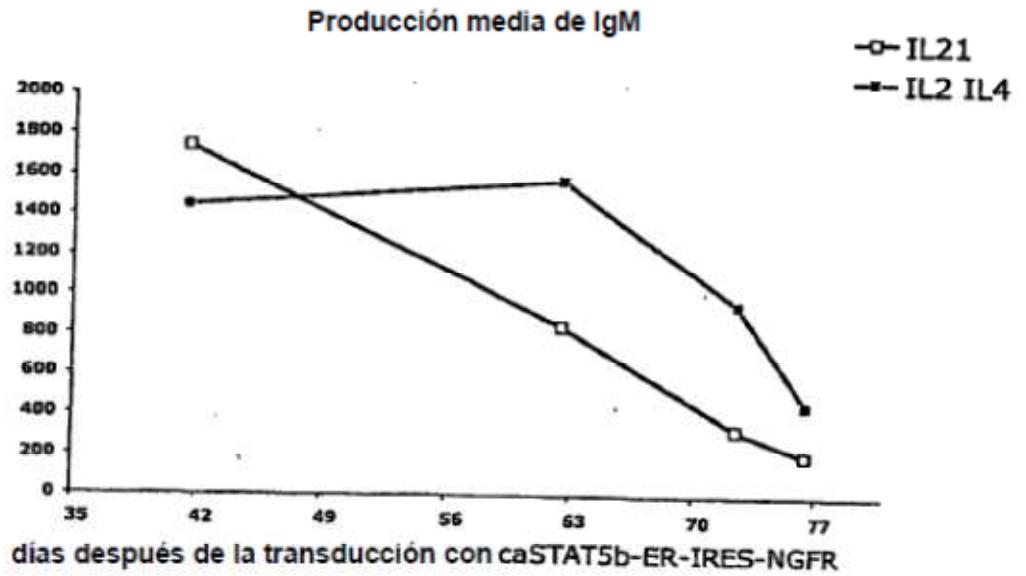


Figura 9

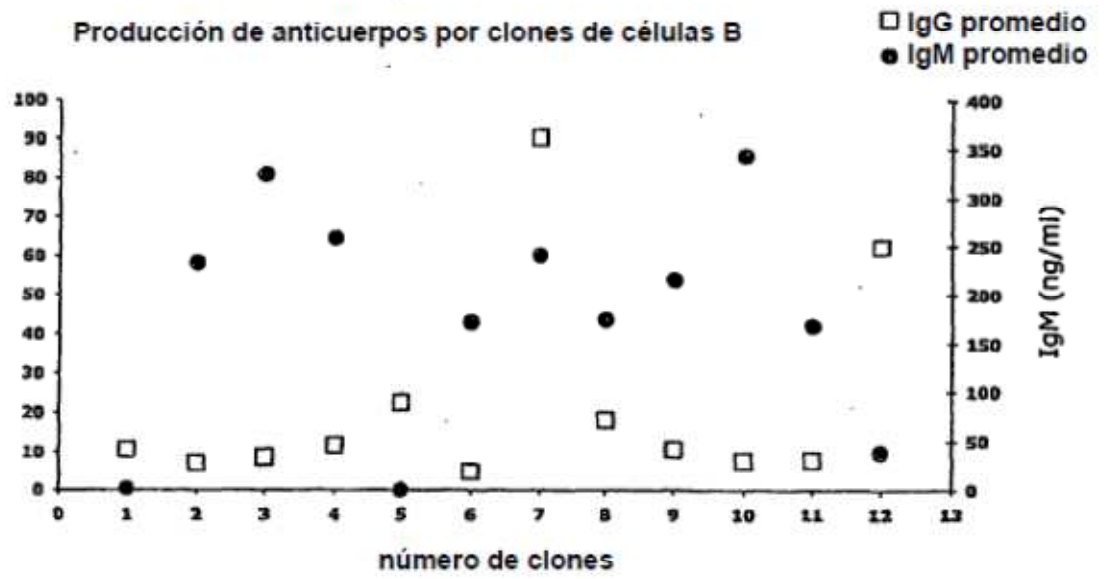


Figura 10a

ELISA IgG para Toxoide Tetánico de células B clasificadas TT policlonales

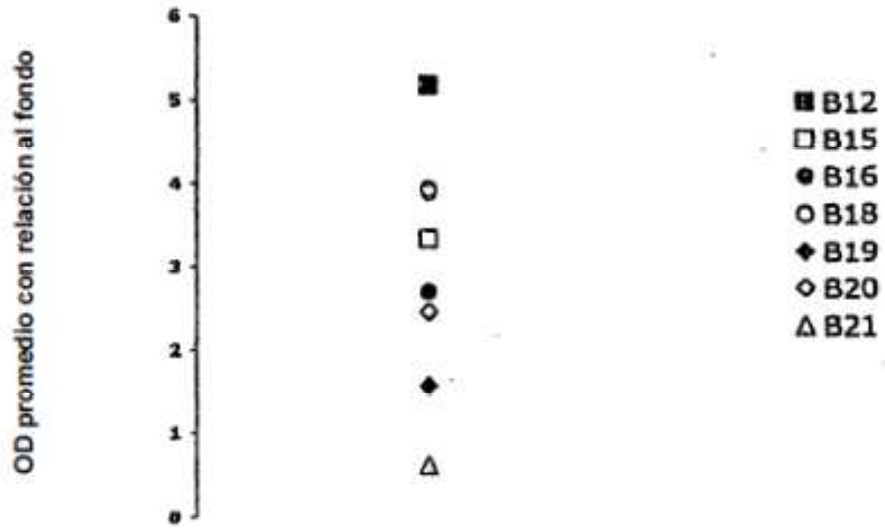


Figura 10b

Producción media de IgM por células B TT+ policlonales

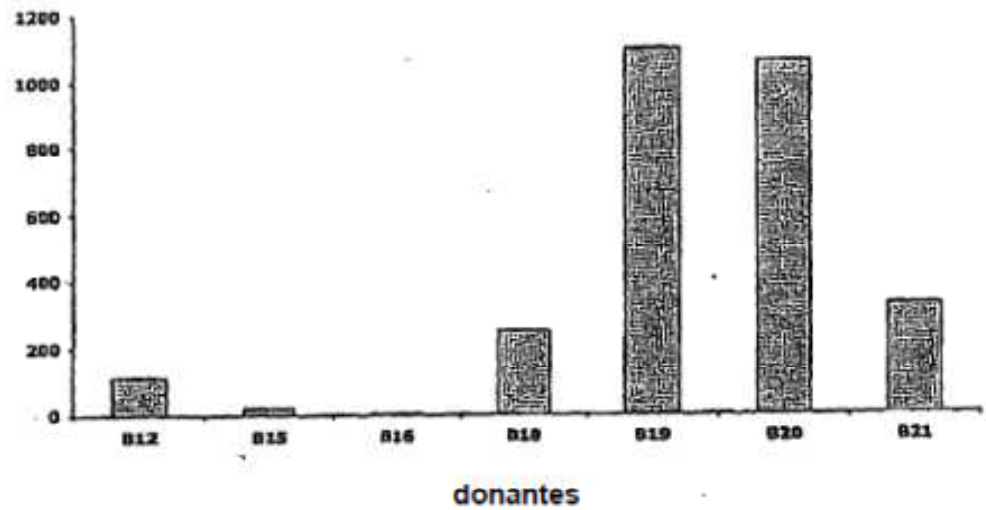


Figura 11

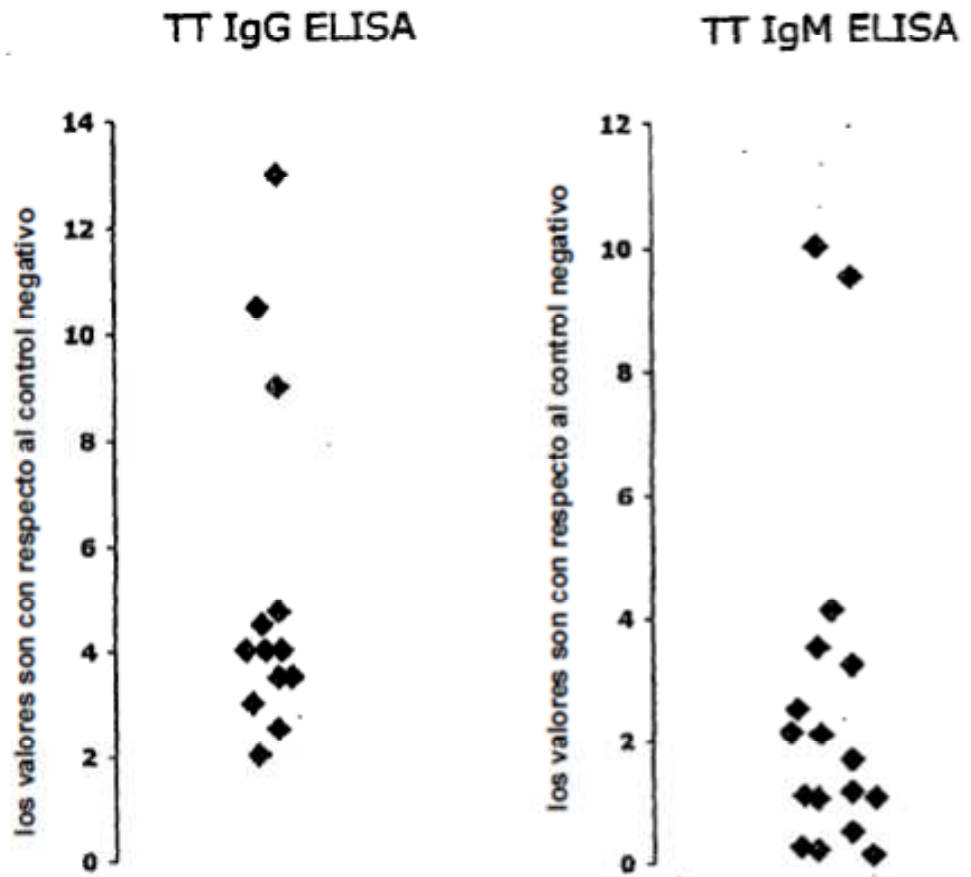


Figura 12a

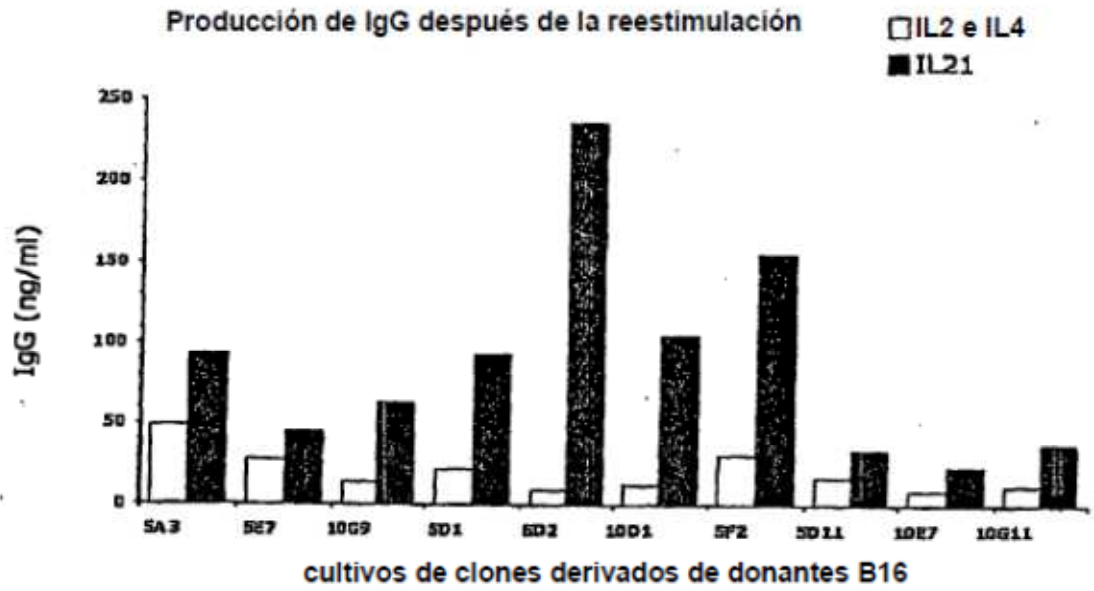


Figura 12b

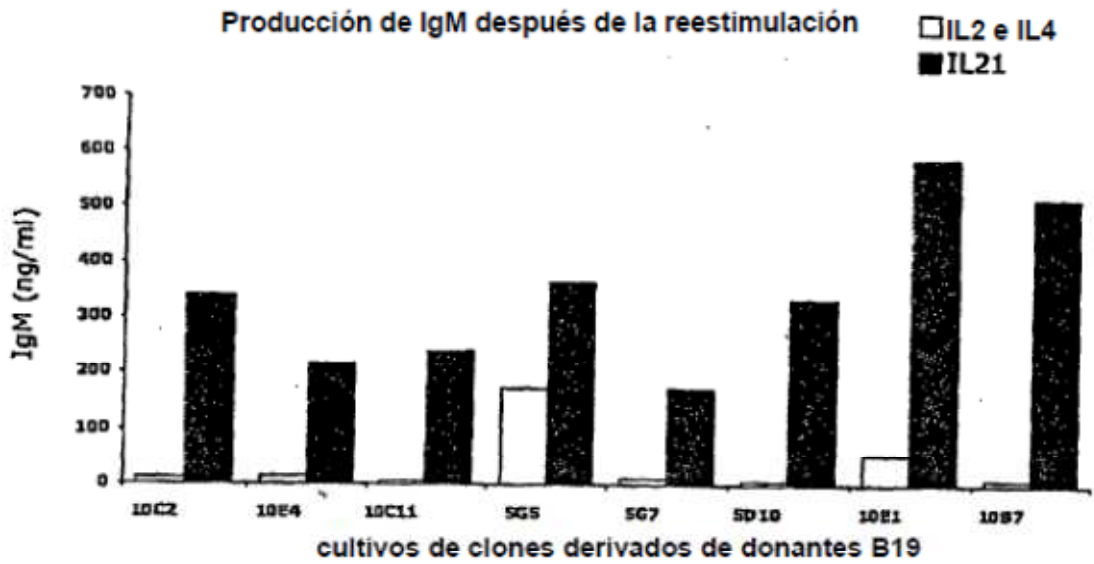


Figura 13a

ELISA IgG anti-TT; muestras obtenidas después de la reestimulación

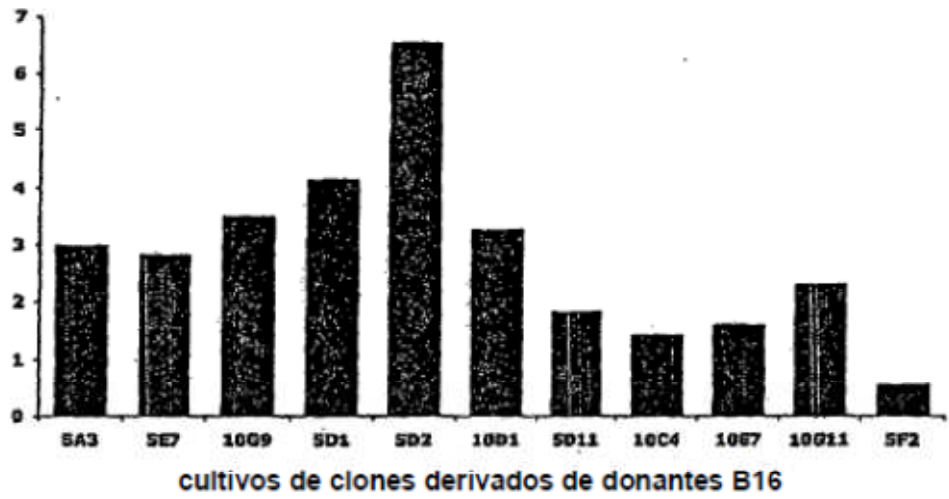


Figura 13b

ELISA IgM anti-TT; muestras obtenidas después de la reestimulación

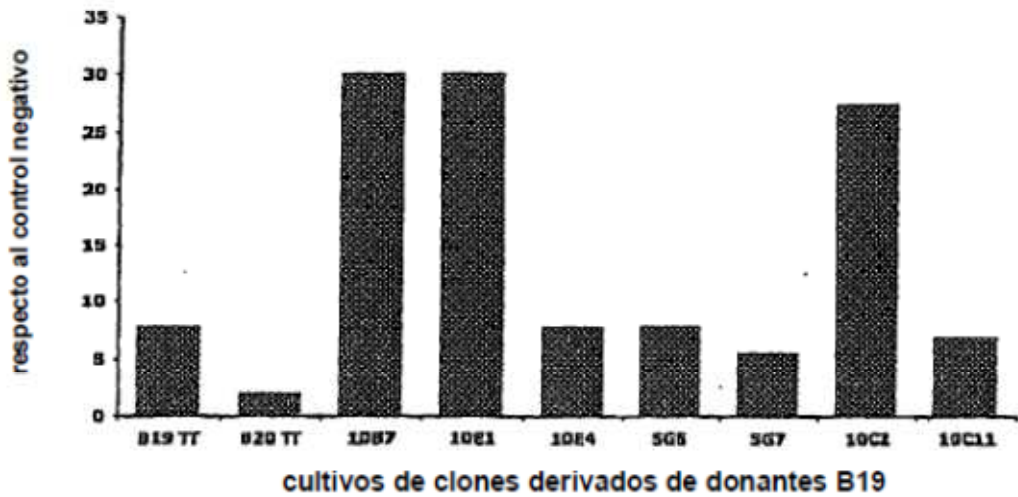


Figura 14

Marcador
Be3-F3
Be3-E9
B28 UTD
Ce3-B11
Be3-D8
Be2-C3
Be3-E4
Be2-G9
Ce2-C9
Ce2-B10
Ce2-D9
Ce2-F2
JY
Ce2-B9
Ce2-G9
B29 UTD

Figura 15

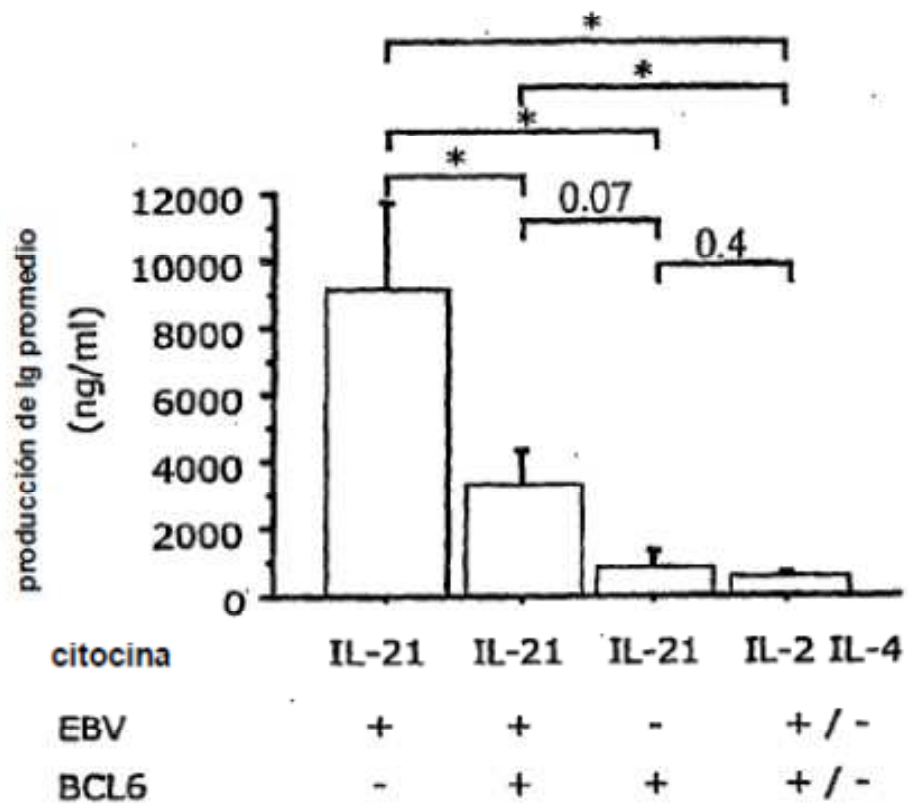


Figura 16

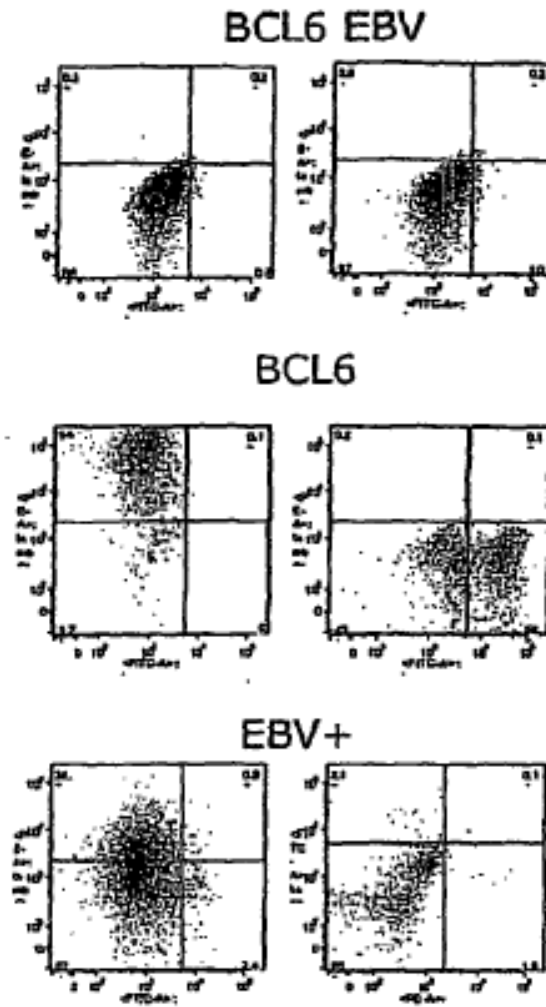


Figura 17

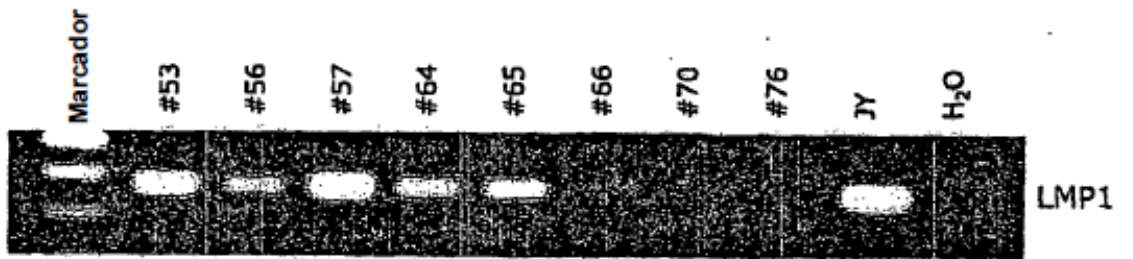
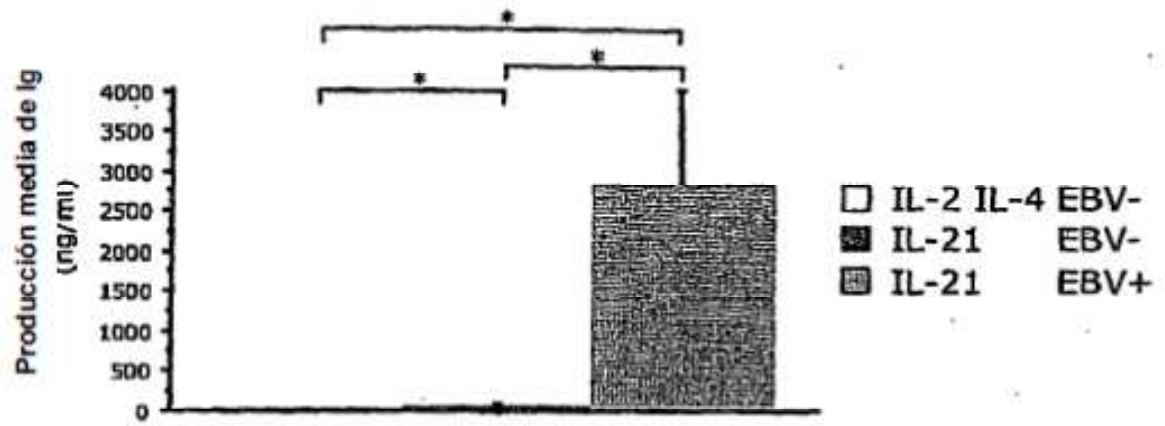


Figura 18



*indica $P < 0,05$, prueba paralela de Mann-Whitney

Figura 19

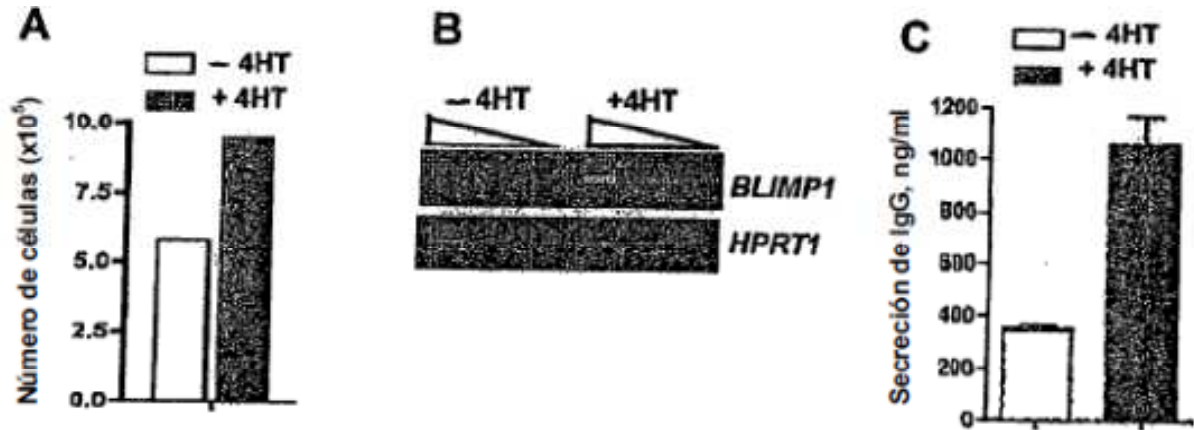


Figura 20

Crecimiento a largo plazo de células B transducidas con BCL-XL y BCL-6

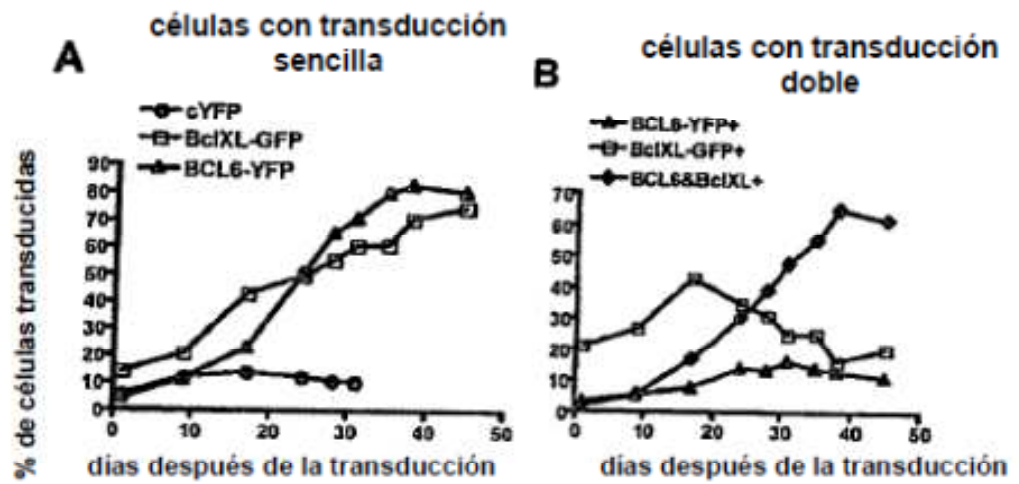


Figura 21

IL-21 aumentó la proliferación de células B transducidas con BCL-XL, BCL6 o células con doble transducción con BCL-XL+BCL6

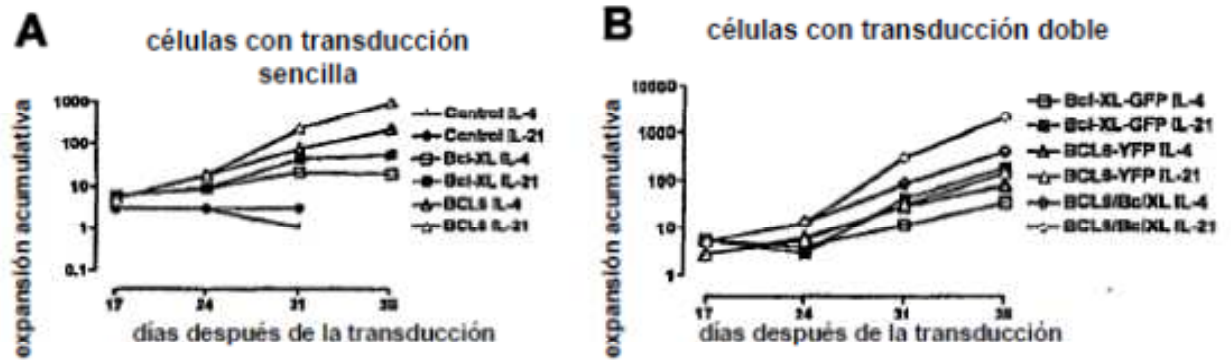


Figura 22

Los cultivos a largo plazo son EBV⁻

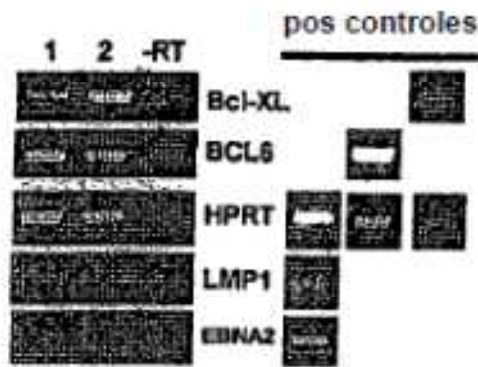


Figura 23

Tiempo de duplicación de células sometidas a transducción doble con BCL-XL, BCL6 Y BCL-XL-BCL6

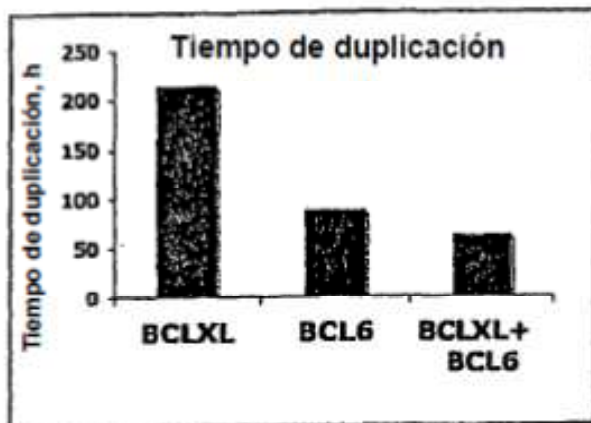


Figura 24

