

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 584**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/NL2010/050458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10734366 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2454283**

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

30 Prioridad:

15.07.2009 EP 09165603

15.07.2009 US 225882 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2018

73 Titular/es:

AIMM THERAPEUTICS B.V. (100.0%)

Meibergdreef 45

1105 BA Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

BEAUMONT, TIM;

SPITS, HERGEN;

KWAKKENBOS, MARK JEROEN y

BAKKER, ADRIANUS QUIRINUS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 666 584 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para producir anticuerpos de alta afinidad

Campo:

5 La invención se refiere al campo de la biología celular. Más específicamente, la invención se refiere al campo de la producción de anticuerpos. La invención proporciona métodos y medios para la producción y/o selección in vitro de anticuerpos altamente específicos.

10 Las estirpes celulares monoclonales estables de células B primarias humanas inmortalizadas que expresan el receptor de células B (BCR) sobre su superficie celular mientras secretan anticuerpos son herramientas atractivas para el estudio de diversos aspectos de la señalización de BCR pero también para la generación de anticuerpos monoclonales humanos. La expresión de BCR en células B humanas inmortalizadas policlonales facilitaría la selección de células específicas a antígeno sobre la base de la unión del antígeno al BCR específico, mientras que la producción de anticuerpos permite la selección de clones de células B sobre la base de actividades funcionales de los anticuerpos secretados. Mientras que las células B vírgenes y de memoria expresan BCR de superficie celular, no secretan Ig. Es posible que las células que expresan BCR y secretan anticuerpos estén presentes en la zona de luz del centro germinal (GC). Estas células pueden representar plasmablastos listos para ser seleccionados en el compartimiento de células plasmáticas.

20 El GC consiste de dos áreas, la zona de oscuridad y la de luz, que están pobladas por centroblastos y centrocitos, respectivamente. Las células B vírgenes y de memoria activadas por antígeno en el GC se someten a extensa proliferación, acompañada por hipermutación somática (SHM) y recombinación en cambio de clase (CSR) de genes de Ig, procesos mediados por citidina-desaminasa inducida por activación (AID). Las células B de GC de la zona de luz luego se someten a selección a través de la interacción BCR-antígeno sobre células dendríticas foliculares y reciben la ayuda de células T auxiliares foliculares, en última instancia, el desarrollo en células de memoria o plasmáticas que secretan anticuerpos. Estas células B de GC de zona de luz seleccionadas expresan Bcl-xL, un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 antiapoptótica más probablemente para protegerlos contra la muerte celular. Las hipermutaciones somáticas y recombinación de cambio de clase de genes Ig ya no se producen en la zona de luz.

30 Las células B maduras se pueden cultivar in vitro bajo condiciones que imitan algunos aspectos clave de la reacción de GC; es decir, la activación de células B con el ligando CD40 (L) y la presencia de citoquinas como la interleuquina (IL)-4, IL-10 o IL-21. Mientras que las células B cultivadas con CD40L, IL-2 e IL-4 producen muy poco Ig, la adición de IL-21 conduce a la diferenciación para células plasmáticas acompañadas por alta secreción de Ig (Ettinger, R. et al. J Immunol 175, 7867-79 (2005); Kuo, T.C. et al. J Exp Med 204, 819-830 (2007)). Aunque este sistema in vitro ha demostrado ser útil para estudiar algunos aspectos de la diferenciación de células B, tanto las células B IgD+ vírgenes como las células B de memoria IgD conmutadas finalmente se diferencian en células plasmáticas terminalmente diferenciadas, que son acompañadas por la detención del ciclo celular que precluye la generación de BCR específico a antígeno de estirpes celulares positivas a largo plazo.

35 Los avances recientes han proporcionado información sobre cómo múltiples factores de transcripción, que incluyen proteína de maduración 1 inducida por linfocito B (BLIMP1), proteína 1 de unión X-box (XBP1) y linfoma de células B (BCL)6 controlan el desarrollo de células B de GC en células plasmáticas productoras de anticuerpos detenidos terminalmente. Se ha mostrado que el BCL6 represor transcripcional previene la diferenciación de células plasmáticas. El BCL6 se expresa altamente en células B de GC en las que facilita la expansión de las células B mediante la regulación negativa de p53 y previene la diferenciación prematura de las células de GC en células plasmáticas al regular negativamente BLIMP1.

45 Los cultivos celulares ex vivo son herramientas importantes en aplicaciones biológicas y médicas actuales. Una aplicación importante es el cultivo de células que producen anticuerpos con el fin de cosechar anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) representan múltiples copias idénticas de una única molécula de anticuerpo que se une a antígenos copias con la misma afinidad y promueven las mismas funciones efectoras. Entre los beneficios de los mAbs se encuentra su especificidad para el mismo epítipo en un antígeno. Esta especificidad confiere ciertas ventajas clínicas sobre los mAbs sobre los tratamientos más convencionales mientras que ofrecen a los pacientes una opción de terapia efectiva, bien tolerada con efectos secundarios generalmente bajos. Más aún los mAb son útiles para la investigación biológica y médica.

50 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para producir y/o seleccionar anticuerpos de alta afinidad.

La invención proporciona un método para modular la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en una célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto, que comprende inducir, mejorar y/o mantener expresión de Bcl-6 en una célula B y inducir, mejorar y/o mantener expresión de un ácido nucleico antiapoptótico en dicha célula B, generando de esta manera un anticuerpo que produce célula B del tipo plasmablasto, en el que el método comprende adicionalmente modular la actividad funcional de AID en dicha célula B.

Preferiblemente, una célula B de memoria con una especificidad deseada se aísla y se somete a un método de acuerdo con la presente invención, de tal manera que se obtienen células B que producen anticuerpos del tipo plasmablasto con

una especificidad deseada. De esta manera se proporciona adicionalmente un método para modular la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en una célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto, que comprende inducir, mejorar y/o mantener la expresión de Bcl-6 en una célula B de memoria e inducir, mejorar y/o mantener expresión de un ácido nucleico antiapoptótico en dicha célula B de memoria, generando de esta manera una célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto; el método comprende adicionalmente modular la actividad funcional de AID en dicha célula B de memoria y/o en dicha célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto. Preferiblemente, se modula la actividad funcional de AID en dicha célula B de memoria. Dicha célula B de memoria posteriormente se convierte en una célula que produce anticuerpo del tipo plasmablasto en las que se modula la actividad funcional de AID.

Como se utiliza en este documento, el término "ácido nucleico antiapoptótico" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de retrasar y/o prevenir la apoptosis en una célula B. Preferiblemente, dicho ácido nucleico antiapoptótico es capaz de retrasar y/o prevenir la apoptosis en una células B que produce anticuerpos del tipo plasmablasto. Preferiblemente, se utiliza un ácido nucleico antiapoptótico, que comprende un ácido nucleico exógeno. Esto significa que, ya sea que se utilice una secuencia de ácidos nucleicos que no se expresa naturalmente en plasmablastos, o que se utiliza una copia adicional de un ácido nucleico de origen natural, de tal manera que la expresión en las células B del tipo plasmablasto resultantes se mejora en comparación con los plasmablastos naturales. Diversos ácidos nucleicos antiapoptóticos son conocidos en la técnica, de tal manera que diversas realizaciones están disponibles. Preferiblemente, se utiliza un ácido nucleico antiapoptótico, que es un miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2 porque las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas son buenos inhibidores de la apoptosis. Muchos procesos que se controlan por la familia Bcl-2 (cuya familia incluye tanto proteínas pro-apoptóticas como antiapoptóticas) se refieren a la ruta mitocondrial de la apoptosis, como se indica en más detalle en este documento a continuación. Los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptótica Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 y MCL-1 generalmente se integran con la membrana mitocondrial externa. Se unen directamente e inhiben las proteínas pro-apoptóticas que pertenecen a la familia Bcl-2 para proteger la integridad de la membrana mitocondrial.

En una realización particularmente preferida, dicho ácido nucleico antiapoptótico codifica Bcl-xL y/o Mcl-1 y/o una parte funcional de Bcl-xL y/o una parte funcional de MCL-1. Como se demuestra en los ejemplos, una combinación de ácidos nucleicos de Bcl-6 y Bcl-XL, así como una combinación de ácidos nucleicos de Bcl-6 y Mcl-1, es particularmente adecuada para inmortalizar células B y el cultivo a largo plazo de las células B del tipo plasmablasto resultantes. Aún más preferiblemente, dicho ácido nucleico antiapoptótico codifica Bcl-xL o una parte funcional del mismo, debido a una combinación de Bcl-6 y Bcl-xL estabiliza las células B particularmente bien.

Una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1 se definen aquí como fragmentos de Bcl-xL y de Mcl-1, respectivamente, que han conservado el mismo tipo de características antiapoptóticas como Bcl-xL y Mcl-1 de longitud completa, respectivamente, en especie (pero no necesariamente en cantidad). Los fragmentos funcionales de Bcl-xL y Mcl-1 son fragmentos normalmente más cortos de Bcl-xL y MCL-1 que son capaces de retrasar y/o prevenir la apoptosis en una de células B. Dichos fragmentos funcionales, por ejemplo están desprovistos de secuencias que no contribuyen a la actividad antiapoptótica de Bcl-xL o MCL-1.

Dicha célula que produce anticuerpos comprende preferiblemente una célula de mamífero. Los ejemplos no limitantes incluyen las células que producen anticuerpos derivados de un individuo humano, roedor, conejo, llama, cerdo, vaca, cabra, caballo, mono, chimpancé, macaco y gorila. Preferiblemente, dicha célula que produce anticuerpo comprende una célula humana, una célula murina, una célula de conejo, una célula de mono, una célula de chimpancé, una célula de macaco y/o una célula de llama. Más preferiblemente, dicha célula que produce anticuerpo comprende una célula B humana.

En una realización preferida, dicha célula B de memoria es una célula B de memoria humana. En aún otra realización preferida, dicha célula B de memoria es una célula B de memoria de sangre periférica. Las células B de memoria de sangre periférica se obtienen fácilmente, sin mucha incomodidad para el individuo del cual se derivan, y parecen ser muy adecuadas para uso en un método de acuerdo con la presente invención.

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que la modulación de la actividad funcional de AID afecta a la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Está bien documentado que las células B vírgenes y de memoria humanas se pueden cultivar durante un periodo limitado después del acoplamiento de CD40 en presencia de citoquinas, que incluyen IL-2, IL-4 e IL-10 (Rousset F et al. PNAS 89, 1890-1893 (1992); Banchereau J et al. Science 251, 70-72 (1991)) y se considera que este sistema imita la respuesta in vivo de las células B hacia las células T auxiliares que expresan CD40L cebado con antígeno cognado. Sin embargo, solo se conocen en parte los mecanismos de regulación de la supervivencia y la proliferación de células B maduras cultivadas bajo estas condiciones.

Una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo se define como una célula que es capaz de proliferar y capaz de producir y/o que secreta el anticuerpo o un equivalente funcional del mismo. Dicha célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo es estable durante por lo menos seis semanas, más preferiblemente por lo menos nueve semanas, más preferiblemente durante por lo menos tres meses, más preferiblemente durante por lo menos seis meses.

Un método mejorado para generar una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo se describió recientemente en el documento PCT/NL2008/050333. De acuerdo con este método, la cantidad de miembros de la familia Bcl-6 y Bcl-2, Bcl-xL preferiblemente, se modulan en una célula B, preferiblemente una célula B de memoria, para generar una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. En el documento PCT/NL2008/050333 la cantidad de producto de expresión Bcl-6 y/o Bcl-xL ya sea es influenciada directa o indirectamente. Preferiblemente, se incrementan las cantidades de ambos productos de expresión de Bcl-6 y Bcl-xL dentro de dicha célula que produce anticuerpo, ya que ambos productos de expresión están involucrados en la estabilidad de una células B de memoria que produce anticuerpo. Dicha Bcl-xL es un miembro de la familia Bcl-2 antiapoptótica. Los procesos que están controlados por la familia Bcl-2, que incluye ambas proteínas pro- y antiapoptóticas, se refieren a la ruta mitocondrial de la apoptosis. Esta vía procede cuando las moléculas secuestradas entre las membranas mitocondriales externas e internas se liberan en el citosol por permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Los miembros de la familia pro-apoptótica se pueden dividir en dos clases. Las moléculas efectoras Bax y Bak, que contienen dominios denominados dominio de homología 3 de Bcl-2 (BH3), están involucradas en permeabilizar la membrana mitocondrial externa mediante la formación de poros proteolipídicos; las proteínas con solo BH3 pro-apoptótico (Bad, Bik, Bim, Bid, Hrk, Bmf, bNIP3, Puma y Noxa) funcionan sobre diferentes estreses celulares mediante interacciones de proteína-proteína con otros miembros de la familia Bcl-2 (antiapoptótica) (Boise, L. H. et al. Cell 74, 597-608 (1993); Adams J.M. et al. Current Opinion in Immunology 19, 488-496 (2007); Chipuk, J.E. et al. Trends in Cell Biol 18, 157-163 (2007)). Los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptótica Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 y Mcl-1 generalmente se integran con la membrana mitocondrial externa. Se unen directamente e inhiben las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas para proteger la integridad de la membrana mitocondrial.

Se prefiere, adicionalmente que se incube dicha célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo con IL 21 y CD40L. Una célula B, tal como una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo, se cultiva preferiblemente en presencia de CD40L ya que la replicación de la mayoría de las células B se ve favorecida por CD40L. Se prefiere, adicionalmente que el STAT3 se active en dicha célula B de memoria que produce anticuerpo. La activación de STAT3 se puede lograr en una variedad de maneras. Preferiblemente, el STAT3 se activa al proporcionar una célula que produce anticuerpo con una citoquina. Las citoquinas, están naturalmente implicadas en la diferenciación de células B, son muy efectivas en la regulación de proteínas STAT. Se sabe que los activadores muy efectivos de STAT3 son IL 2, IL 10, IL 21 e IL 6, pero también IL 7, IL 9, IL 15, IL 23 e IL 27 activan el STAT3. Adicionalmente, o alternativamente, la activación de STAT3 se lleva a cabo mediante transferencia a una célula B de un ácido nucleico que codifica un mutante de STAT3 que confiere activación constitutiva a STAT3. (Sean A Diehl, Heike Schmidlin, Maho Nagasawa, Simon D van Haren, Mark J Kwakkenbos, Etsuko Yasuda, Tim Beaumont, Ferenc A Scheeren, Hergen Spits STAT3- mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation J Immunol 2008 vol. 180 (7) pp. 4805-15)

Más preferiblemente se utiliza IL 21, ya que el IL 21 es particularmente adecuado para influir en la estabilidad de una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Adicionalmente a la regulación positiva de STAT3, IL 21 es capaz de regular positivamente la expresión de Blimp 1 incluso cuando la expresión de Blimp 1 es contrarrestada por BCL6. Con los métodos divulgados en el documento PCT/NL2008/050333, se ha hecho posible aumentar la duración de la vida replicativa de una célula que produce anticuerpos, ya que es posible mantener una célula B en una etapa de desarrollo en la que se produce la replicación. En cultivos de células B ex vivo anteriores la duración de la vida replicativa fue sólo de unas pocas semanas a dos meses. Durante este tiempo las células cultivadas pierden su capacidad de replicarse, su capacidad de producir anticuerpos y/o su capacidad de convertirse en una célula que produce anticuerpos. Con un método como se divulgó en el documento PCT/NL2008/050333, sin embargo, se ha hecho posible prolongar la duración de la vida replicativa de las células B de memoria que producen anticuerpos, de tal manera que se generan cultivos ex vivo, que comprende células B del tipo plasmablasto que son capaces de replicar y producir anticuerpos.

La citidina desaminasa inducida por activación (AID) desamina los residuos de desoxicitidina en genes de inmunoglobulina, que desencadena la diversificación de anticuerpos. Se demostró en la solicitud de patente US2008305076 que el IL 21 induce expresión de BLIMP, Bcl-6 y AID, pero no hipermutación somática. En contraste con esta demostración, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la modulación de la actividad funcional de AID en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo se estimularon con IL 21 claramente resulta en la modulación de la incidencia de la hipermutaciones somáticas. Por lo tanto, contrariamente a la enseñanza del documento US2008305076, la presente invención proporciona métodos en los que las células B se cultivan en presencia de IL 21 y CD40L y en los que se modula la ocurrencia de hipermutación somática en células B del tipo plasmablasto que producen anticuerpo.

En una realización, la actividad funcional de las AID se reduce en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Esto resulta en una reducción de la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en dicha célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. La actividad funcional de AID se reduce preferiblemente al reducir la expresión y/o actividad específica de AID en la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Como se explicó anteriormente, en una realización preferida, la actividad funcional de AID se reduce en una célula B (tal como una célula B de memoria) que se desarrolla posteriormente en una célula B del tipo plasmablasto. Esto permite un procedimiento relativamente simple, en el que se cosecha una célula B con una especificidad de interés, en la que después de que se reduce la actividad funcional de AID en dicha célula y la expresión de Bcl-6 y de un ácido nucleico antiapoptótico en dicha célula se inducen, mejoran o mantienen. Dicha célula se desarrolla posteriormente en una célula B del tipo

plasmablasto que produce anticuerpo en la que la actividad funcional de AID se reduce, de tal manera que se reduce la ocurrencia de hipermutación somática en la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo resultante durante cultivo prolongado. También es posible proporcionar una célula B de memoria con una secuencia de ácidos nucleicos que es capaz de reducir de forma condicional la actividad de AID. En esta realización, la actividad de AID en una célula B de memoria o en las células B del tipo plasmablasto resultantes se regula bien.

Los métodos para reducir la expresión de AID se conocen en la técnica. Una reducción del nivel de expresión de AID se puede lograr en el nivel transcripcional, el nivel de ARNm, o el nivel de proteínas, o una combinación de los mismos. Dicha reducción está preferiblemente a un nivel de a lo sumo 75%, más preferiblemente a lo sumo 60%, más preferiblemente a lo sumo 50%, más preferiblemente a lo sumo 40%, más preferiblemente a lo sumo 30%, más preferiblemente a lo sumo 20%, más preferiblemente a lo sumo 10%, más preferiblemente a lo sumo 5% o el nivel de expresión en el que se expresa AID en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo no tratada.

Una reducción del nivel de expresión de AID, por ejemplo, se logra mediante introducción en una célula B (preferiblemente una célula B de memoria) de una proteína de dedo de zinc (no natural) que se ha modificado para que sea capaz de unirse a la región promotora de AID y que se acopla a un dominio represor de transcripción, tal como un dominio represor S/B de caja asociados a Kruppel. Los métodos para diseñar proteínas de dedo de zinc que unen secuencias de nucleótidos específicas son conocidos en la técnica y se divulgan, por ejemplo por Tan S et al. PNAS 100, 11997-12002 (2003), que se incluye en el presente documento como referencia.

Como un ejemplo adicional, una reducción del nivel de expresión de AID se puede lograr mediante la introducción de una molécula en una célula B que interfiere con la activación transcripcional de AID en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Se sabe que la expresión de AID se modula por las proteínas de hélice-bucle-hélice básica (bHLH), tales como, por ejemplo, E47 y E12, que son a la vez codificadas por el gen E2A. Se sabe que los factores de transcripción de bHLH forman homodímeros y/o heterodímeros. Una molécula que interfiere con la homo- o heterodimerización de E47 y/o E12 de este modo interferirá con la activación transcripcional de AID en la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Por lo tanto, la introducción en una célula B de una molécula que interfiere con la homo- o heterodimerización de E47 y/ E12 resulta en una reducción del nivel de expresión de AID.

En una realización, dicha molécula es una molécula de compuesto. El término "compuesto" se refiere a compuestos inorgánicos u orgánicos tales como polinucleótidos, lípidos o análogos de hormona que se caracterizan por pesos moleculares relativamente bajos. Otros compuestos de ensayo orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos que comprenden desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 aminoácidos y polipéptidos más grandes que comprenden desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 500 aminoácidos, tales como anticuerpos o conjugados de anticuerpos. Las colecciones de compuestos, tales como colecciones de péptidos (por ejemplo LOPAPTM, Sigma Aldrich), colecciones de lípidos (BioMol), colecciones de compuestos sintéticos (por ejemplo LOPACTM, Sigma Aldrich) o colecciones de compuestos naturales (Specs, TimTec), se pueden cribar para identificar uno o más compuestos que se unen e interfieren con la homo- o heterodimerización de E47 y/o E12, y por lo tanto con la activación transcripcional de los homo- o heterodímeros E47 y/o E12.

La afinidad de unión de un compuesto a un polipéptido E47 y/o E12 se mide por cualquier método conocido en la técnica, tal como por ejemplo el uso de biosensores de resonancia de plasmón superficial (Biacore), mediante análisis de unión de saturación con un compuesto marcado (por ejemplo, análisis de Scatchard y Lindmo), mediante espectrofotómetro UV diferencial, ensayo de polarización de fluorescencia, sistema de Lector de Placas de Formación de Imágenes Fluorométrico (FLIP @), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia. La afinidad de unión de compuestos también se puede expresar en una constante de disociación (Kd) o como IC50 o EC50. La IC50 representa la concentración requerida de un compuesto para obtener una inhibición del 50% de la unión de un socio de dimerización al polipéptido. La EC50 representa la concentración requerida para obtener 50% del efecto máximo en cualquier ensayo que mide la dimerización y/o activación de la transcripción de homo- o heterodímeros E47 y/o E12. La constante de disociación, Kd, es una medida de lo bien que un compuesto se une al polipéptido, es equivalente a la concentración de compuesto requerida para saturar exactamente la mitad de los sitios de unión sobre el polipéptido. Los compuestos con una unión de alta afinidad tienen bajos valores de Kd, IC50 y EC50, es decir, en el rango de 100 nM a 1 pM; una moderada a baja afinidad de unión se refiere a altos valores de Kd, IC50 y EC50, es decir, en el rango micromolar.

Preferiblemente, los compuestos son compuestos de bajo peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular, es decir con un peso molecular de 500 Dalton o menos, tienen buena absorción y permeabilidad en los sistemas biológicos y por consiguiente tienen más probabilidades de ser candidatos a fármacos exitosos que los compuestos con un peso molecular superior a 500 Dalton.

En un método preferido de acuerdo con la invención, dicha molécula es un inhibidor de la unión al ADN (ID). Las proteínas de ID comprenden una familia de cuatro que se denominan ID1, ID2, ID3 e ID4 y que son capaces de dimerizarse con proteínas de bHLH E12 y/o E47 y evitar la unión de ADN de estas proteínas bHLH. La expresión de AID se modula preferiblemente mediante la (sobre)expresión de proteínas DI en dicha célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Las moléculas más preferidas son ID2 y, aún más preferida, ID3. Se ha descrito que las proteínas ID están involucradas en la regulación de la expresión de AID mediante la unión a, y la regulación de las proteínas E, especialmente E47 (Kee B.L. Nat Rev Immunol 9, 175-84 (2009)). Se encontró por los presentes inventores que los

- niveles de expresión de AID en células B del tipo plasmablasto que producen anticuerpos disminuye en la presencia de proteínas de ID. El crecimiento celular es un poco obstaculizado en células que expresan ID2, además de Bcl-6 y Bcl-xL. Este no es el caso para ID3. Por lo tanto, se prefiere el uso de ID3. Por lo tanto, mediante la sobreexpresión de ID, la expresión de AID y posterior acumulación de mutaciones somáticas en las cadenas VH y VJ de las inmunoglobulinas que se expresan en la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo, están limitadas o incluso bloqueadas. Preferiblemente, ID se expresa condicionalmente en dicha célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo, por ejemplo después de la administración de un determinado inductor. De esta manera, la extensión de la expresión ID - y, por lo tanto, la medida de la expresión de AID - se regulará bien. Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión condicionales se describen en el presente documento a continuación.
- En aún otra realización preferida, dicha molécula es un ácido nucleico antisentido y/o ribozima, preferiblemente una ribozima de cabeza de martillo de longitud completa, dirigido contra E12 y/o E47. Dicho ácido nucleico antisentido comprende preferiblemente un tramo de más de 50 moléculas de ácido nucleico que son antisentido y pares de bases con un transcrito de ARN que codifica la proteína E12 y/o E47. La expresión de ARN antisentido a menudo lleva a la formación de moléculas de ARN de doble cadena, que comprende el ARN antisentido y el ARNm de sentido endógeno. Esta molécula de ARN de doble cadena evita que el ARNm sea traducido en proteína.
- En aún otra realización preferida, dicha molécula es una molécula de ARNds que induce la degradación del ARNm empleando la interferencia de ARN (iARN). El iARN se basa en la generación de ARN corto, de doble hebra (ARNds) que activa un proceso celular normal que conduce a una degradación del ARN altamente específico (Zamore et al. Cell 101, 25-33 (2000)) y/o supresión de la traducción. Estudios recientes han demostrado que la interferencia de ARN está mediada por la generación de moléculas de 18 a 23 nucleótidos de ARNds con salientes 3' de 2 nucleótidos de longitud denominados dúplex de ARN de interferencia (ARNsi) pequeños. El ARNi permite el silenciamiento de un gen sobre la base de su secuencia. Para la expresión de moléculas de ARNds en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo, un casete de expresión que codifican las dos cadenas de la molécula dúplex ARNds comprende preferiblemente un potenciador/promotor de polimerasa III. Un potenciador/promotor de polimerasa III preferido se selecciona del promotor U6 y H1. Un potenciador/promotor de polimerasa III dirige preferiblemente la expresión de cadenas de ARN de interferencia (ARNsi) pequeñas que sobre la formación de dúplex mediante emparejamiento de bases comprenden moléculas de ARNsi de doble cadena con longitud de 18-23 (normalmente 19) nucleótidos con 2 salientes 3' con longitud de 2 nucleótidos con una de las cadenas que exhibe una extensa homología a una parte de un transcrito de ARNm que codifica la proteína de bHLH E12 y/o E47. Dicho ARNsi activa la ruta de interferencia de ARN (ARNi) e interfiere con la expresión de dicho gen.
- Un casete de expresión para expresión de un ácido de ARN antisentido y/o una o ribozima de una proteína, tal como una proteína de dedo de zinc o una proteína de ID, preferiblemente comprende un potenciador/promotor que es adecuado para expresar una molécula de ARN en dicha estirpe celular, y una señal de parada de transcripción, tal como, por ejemplo una señal poli(A) si el promotor es un promotor de polimerasa II. Dicho potenciador/promotor y la señal de parada de la transcripción son preferiblemente vinculadas funcionalmente para impulsar la expresión del ARN en la estirpe celular. Dicho potenciador/promotor es preferiblemente un promotor de polimerasa II o un potenciador/promotor de polimerasa III. Un potenciador/promotor de polimerasa II impulsa la expresión de precursores de ARNm predominantemente. Un potenciador/promotor de polimerasa II preferido se selecciona entre el gen temprano inmediato de citomegalovirus humano, el promotor de SV40, y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.
- En una realización preferida de la invención, la actividad funcional de AID en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo se modula por la expresión condicional de, por ejemplo, una proteína de dedos de zinc o de ID, preferiblemente ID2 y/o ID3. Dicha célula B también se transduce con Bcl-6 y un ácido nucleico antiapoptótico. El aumento de la expresión de genes de, por ejemplo, ID2 y/o ID3 se puede obtener al hacer dependiente de la expresión de genes en la presencia de un inductor. Adicionalmente, una reducción del nivel de expresión AID se puede obtener por interferencia de ARN en la que la expresión de la molécula de ARNds es dependiente de la presencia de un inductor. Diversos sistemas de expresión génica inducibles están disponibles actualmente que se pueden utilizar para controlar la expresión de AID, ID2 y/o ID3, ARNds, un ARN antisentido, una ribozima, y/o una proteína de dedo de zinc.
- Los sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off (por ejemplo Tet-On® and Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression Systems, Clontech) se pueden utilizar para la expresión inducible de un gen de interés. En estos sistemas de expresión del activador de la transcripción (tTA) se regula por la presencia (Tet-On) o ausencia (Tet-Off) de tetraciclina (TC) o un derivado como doxiciclina (dox). En principio, el tTA se compone de la proteína represora Tet de Escherichia coli (TetR) y dominio transactivador VP16 del virus de Herpes simplex. El tTA regula la transcripción de un gen de interés bajo el control de un elemento sensible a tetraciclina (TRE) que comprende la secuencia de ADN del operador Tet (TetO) y una secuencia promotora, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus humano (hCMV) (Baron, U. and Bujard, H. Methods Enzymol 327, 401-21 (2000)). Un gen que codifica, por ejemplo, ID2 y/o ID3 y/o una proteína de dedos de zinc se puede colocar corriente abajo de este promotor. Preferiblemente, para la expresión de ARNds se utiliza un promotor de polimerasa III de ARN tal como H1 y U6.
- En el sistema Tet-off, el tTA se une a TRE en ausencia de TC o dox (Gossen, M. and Bujard, H. PNAS 89, 5547-51 (1992) y la transcripción de, por ejemplo, el gen ID2 y/o ID3, ARNds y/o un gen que codifica una proteína de dedo de zinc se activa, mientras que en presencia de TC o dox el tTA no puede unirse a TRE y la expresión de, por ejemplo, se

inhibe el gen ID2 y/o ID3, ARNds y/o un gen que codifica una proteína de dedo de zinc. En contraste, el sistema Tet-on utiliza un tTA inverso (rtTA) que sólo puede unir el TRE en presencia de dox (Gossen, M. et al. Science 268, 1766-9 (1995)). La transcripción de, por ejemplo, el gen ID2 y/o ID3, ARNds y/o un gen que codifica una proteína de dedo de zinc se inhibe en ausencia de dox y se activa en presencia de dox.

5 En otra realización, la expresión inducible se ejecuta utilizando un sistema de expresión génica inducible de hormona tal como por ejemplo un sistema de expresión génica inducible de ecdisona (por ejemplo RheoSwitch®, New England Biolabs) (Christopherson, K.S. et al. PNAS 89, 6314-8 (1992)). La ecdisona es una hormona esteroide de insecto de por ejemplo, *Drosophila melanogaster*. En las células transfectadas con el receptor de ecdisona, un heterodímero que
10 ecdisona seleccionado de ecdisona, uno de sus análogos, tales como muristerona A y ponasterona A, y un agonista de ecdisona no esteroideo. En presencia de un agonista, el Ecr y RXR interactúan y se unen a un elemento sensible a ecdisona que está presente en un casete de expresión. La transcripción de una proteína que se coloca en un casete de expresión corriente abajo del elemento sensible a ecdisona de este modo se induce al exponer la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo a un agonista de ecdisona.

15 En aún otra realización de invención se ejecuta la expresión inducible utilizando un sistema de expresión génica inducible por arabinosa (por ejemplo el kit pBAD/gIII, Invitrogen) (Guzman, L.M. et al. Bacteriol 177, 4121-4130 (1995)). La arabinosa es un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono. En las células transfectadas con el promotor de arabinosa inducible luego se puede inducir la transcripción PBAD de un gen situado corriente abajo de PBAD, en presencia de arabinosa.

20

En aún una realización adicional, la actividad funcional de AID se reduce al reducir la actividad específica de AID en el célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo. Una reducción de la actividad específica de AID por ejemplo se alcanza por la adición de un compuesto que interfiere con la actividad enzimática de AID. Un compuesto preferido es un compuesto de bajo peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular, es decir con un peso molecular de 500
25 Dalton o menos, tienen buena absorción y permeabilidad en los sistemas biológicos y por consiguiente tienen más probabilidades de ser candidatos a fármacos exitosos que los compuestos con un peso molecular superior a 500 Dalton. Están disponibles IAS colecciones de compuestos, tales como colecciones de péptidos (por ejemplo LOPAPTM, Sigma Aldrich), colecciones de lípidos (Biomol), colecciones de compuestos sintéticos (por ejemplo LOPACTM, Sigma Aldrich) o colecciones de compuestos naturales (Specs, TimTec), que se pueden cribar para identificar uno o más compuestos
30 que se unen e interfieren con la actividad de AID. Los métodos para determinar la actividad de AID se conocen en la técnica. Por ejemplo, la actividad de la citidina desaminasa se puede medir en un ensayo de mutador bacteriano, en el que la desaminación de ADN mediada por AID en los residuos de citidina resulta en aumento de la frecuencia de las colonias bacterianas resistentes a rifampicina (Rif) que llevan mutaciones en el gen que codifica el objetivo Rif, ARN. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden realizar pruebas de complementación en células B de ratón deficiente en
35 AID, por ejemplo como se describe en Ichikawa et al. J. Immunol. 177, 355-361 (2006).

En aún otra realización, se aumenta la cantidad de AID en una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo, preferiblemente por administración de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica AID a una célula B, preferiblemente una célula B de memoria. A veces es preferible aumentar temporalmente la cantidad de AID con el fin de aumentar las hipermutaciones somáticas en las células B, obteniendo de esta manera la mejora de las variantes de
40 un anticuerpo original de interés. Dicha variante mejorada es preferiblemente un anticuerpo con una mayor afinidad y/o especificidad, en comparación con dicho anticuerpo original de interés. Cuando se ha obtenido una célula B del plasmablasto que produce una variante de interés, la actividad funcional de AID preferiblemente se reduce posteriormente con el fin de contrarrestar las hipermutaciones somáticas adicionales en dicha célula B.

En realizaciones preferidas, se producen células B del tipo plasmablasto en las que la expresión de AID se reduce por la expresión de proteínas de ID. Por lo tanto se proporciona adicionalmente una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante que expresa Bcl-6 y un ácido nucleico antiapoptótico y una proteína de ID. En una realización preferida, se expresan ID2 y/o ID3. Por lo tanto se proporciona adicionalmente una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante que expresa Bcl-6 y un ácido nucleico antiapoptótico y una proteína de ID seleccionada del grupo que consiste de ID2 y ID3. Dichos ácidos nucleicos antiapoptóticos preferiblemente comprenden un ácido
50 nucleico exógeno, como se describió en el presente documento anteriormente. En una realización preferida, se utiliza un ácido nucleico antiapoptótico que es un miembro de la familia Bcl-2. Preferiblemente, dicho ácido nucleico antiapoptótico comprende Bcl-xL o Mcl-1 o una parte funcional de Bcl-xL o una parte funcional de Mcl-1. Por lo tanto se proporciona adicionalmente una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante que expresa Bcl-6 y una proteína de ID y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un compuesto seleccionado del grupo que consiste de Bcl-xL y Mcl-1 y una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1.
55

Preferiblemente, dicha célula B que produce anticuerpo comprende ácidos nucleicos exógenos. Por lo tanto se proporciona adicionalmente una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica Bcl-6 y un ácido nucleico exógeno que codifica una proteína de ID y un ácido nucleico exógeno que codifica un compuesto seleccionado del grupo que consiste de BclxL y Mcl-1 y una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1. Como se dijo anteriormente, dicha proteína de ID preferiblemente comprende ID2 y/o ID3. Por lo tanto una realización preferida proporciona una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante
60

que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica Bcl-6 y un ácido nucleico exógeno que codifica ID2 y un ácido nucleico exógeno que codifica un compuesto seleccionado del grupo que consiste de Bcl-xL y Mcl-1 y una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1. Aún otra realización preferida proporciona una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica Bcl-6 y un ácido nucleico exógeno que codifica ID3 y un ácido nucleico exógeno que codifica un compuesto seleccionado del grupo que consiste de Bcl-xL y Mcl-1 y una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1.

Como se indicó anteriormente, aumentar el AID en (una célula B que se desarrollará en) una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo permite la generación de nuevas inmunoglobulinas que albergan mutaciones que no estaban presentes en la célula B antes de la transducción con BCL6 y un ácido nucleico antiapoptótico. Por ejemplo, cultivar células B del tipo plasmablasto en las que se induce hipermutación somática mediante la expresión de AID permitirá obtener una o más variantes de inmunoglobulina que, por ejemplo, tienen una mayor afinidad para un ligando que es reconocido por la inmunoglobulina, o que son más estables, por ejemplo, en una solución acuosa o bajo un aumento de las condiciones de sal, o cualquier combinación de los mismos. En aún otra realización se selecciona una variante de inmunoglobulina con reducida unión o pérdida de unión al antígeno original. Al analizar las secuencias de VH y VL, es posible determinar los residuos de inmunoglobulina importantes para la unión al antígeno. Por lo tanto, la invención proporciona adicionalmente un uso de una célula B con aumento de la expresión y/o actividad de AID para aumentar la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en una célula B de memoria que produce anticuerpo.

En una realización adicional, la invención proporciona un uso de una célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo con expresión y/o actividad de AID reducida y por lo tanto una menor ocurrencia de hipermutaciones somáticas para producción a gran escala de anticuerpos. El cultivo de células B del tipo plasmablasto en las que se reduce la hipermutación somática o incluso se inhibe por la reducción de la actividad funcional de AID permitirá que estas células produzcan inmunoglobulinas con un menor riesgo de obtener variantes no deseadas. Con el término producción a gran escala se entiende la producción de anticuerpos mediante la célula B del tipo plasmablasto que produce anticuerpo más allá del nivel de exploración, es decir, no para la identificación de una inmunoglobulina. Dicha producción a gran escala se refiere preferiblemente a un cultivo que comprende por lo menos 1 mililitro de medio de cultivo, más preferido por lo menos 5 mililitros, más preferido por lo menos 10 mililitros, más preferido por lo menos 25 mililitros, más preferido por lo menos 50 mililitros, más preferido por lo menos 100 mililitros, más preferido por lo menos 1000 mililitros.

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

30 Leyendas de las figuras

Figura 1

Las células de sangre periférica de memoria CD27⁺ adquieren un fenotipo del tipo GC estable después de la transducción con BCL6 y Bcl-xL y el cultivo posterior (en toda la solicitud de patente estas células se denominan "células B del tipo plasmablasto que producen anticuerpo"), (a) Fenotipo de células B de memoria CD27⁺ transducidas con BCL6+Bcl-xL (6XL, línea de histograma negra) en comparación con las células de GC de las amígdalas (GC, CD38⁺CD20⁺, gris sombreado), células vírgenes y de memoria de amígdala (N/M, CD38-CD20^{bajo}, línea de histograma gris claro), y células plasmáticas de amígdala (PC, CD38⁺⁺CD20^{bajo}, línea de histograma gris oscuro). Las estirpes celulares monoclonales transducidas con BCL6+Bcl-xL muestran un fenotipo idéntico (no mostrado). (b) Niveles de ARNm relativos de AICDA (que codifica AID) en células B de memoria CD19⁺IgG⁺CD27⁺ PB y células B GC de amígdala CD19⁺CD38⁺CD20⁺IgD⁻ (valor establecido como 1) en comparación con células de memoria CD27⁺ en masa transducidas con BCL6+Bcl-xL utilizando RT-PCR cuantitativa.

Figura 2

Expresión y actividad de AID en células transducidas por BCL6+Bcl-xL. (a) Descripción general de todos los subclones D25 que tenían una o más sustituciones de aminoácidos, las mutaciones silenciosas adicionales se muestran en cursiva. (b) niveles de ARNm de AICDA (que codifica AID) en células B GC de amígdalas CD19⁺CD38⁺CD20⁺IgD⁻ y células B de memoria CD19⁺IgG⁺CD27⁺ PB en comparación con estirpes celulares monoclonales transducidas con 23 BCL6+Bcl-xL y estirpe celular específica anti-RSV monoclonal D25, utilizando RT-PCR cuantitativa. (c) Porcentaje de subclones con número indicado de mutaciones de VH, como porcentaje del número total de subclones secuenciados. (d) Ubicación de mutaciones de VH, porcentaje de mutaciones por región VH por pares de bases. (e) Unión del subclon D25 Ig a células HEp2 infectadas con RSV. Los cuadrados son subclones D25 individuales, círculos negros rD25. Los círculos grises indican clones con desviación de afinidad.

Figura 3

El Id regula la expresión AID en células B transducidas con BCL6 Bcl-xL (a) niveles de ARNm de AICDA en la estirpe celular específica anti-RSV monoclonal D25 transducida con Control-YFP, AID-YFP, ID2-YFP o ID3-YFP utilizando RT-PCR cuantitativa. (b) Curvas de crecimiento de la estirpe celular D25 específica a anti-RSV monoclonal transducida con Control-YFP, AID-YFP, ID2-YFP o ID3-YFP.

Figura 4

Unión mejorada y competencia de sobrenadante de células B derivado y proteína recombinante de clones D25 mutados a células HEp2 infectadas con RSV. (a) titulación de sobrenadante de cultivo de células B de 2 clones que se seleccionaron sobre la base de dos sustituciones de aminoácidos idénticos y una mutación adicional en comparación con la secuencia de D25 original (#29: S83Y/V111I/V112L y #189: G63D/V111I/V112L), un clon que pierde la unión a célula infectada con RSV (#77; E107K) y un clon D25 no mutado (#54). Se seleccionaron los clones mutados retrospectivamente después de 1) se realizaron dos pruebas en las que se determinaron ambos niveles de IgG de cultivo y la unión a HEp2 infectada con RSV. Los Igs que mostraron una mayor unión se clasificaron en un top 25. Cuando una Ig estaba en el top 25 dos veces se seleccionó y 2) después se prueba en un experimento de competición se tenían que competir el clon D25 original y 3) tenían mutaciones que podría explicar el fenotipo observado en los experimentos antes mencionados. El reemplazo se realizó como sigue: células Hep2 infectadas con RSV saturadas con PE marcado con D25, se lavaron 3x e incubaron con 250 ng ml⁻¹ de D25-PE + cantidad creciente de subclon D25 de competición (0-800 ng ml⁻¹), se incubaron durante 3 horas a 37°C, lavaron 2x y analizaron en FACS (b) la competencia D25 por mismos clones. Las células Hep2 infectadas con RSV incubadas con 250 ng ml⁻¹ de D25-PE + cantidad creciente de subclon de competición D25 (0-800 ng ml⁻¹) (la misma mezcla que se utilizó para el ensayo de reemplazo), se incubó durante 30 minutos a 4°C, se lava 2x y analiza sobre FACS.

Figura 5

La transducción de las células B de memoria IgG+ humanas con BCL6, Bcl-xL y MCL-1. Se muestran análisis FACS del porcentaje de células que expresan GFP (BCL6 o BCL6 y BclxL) y NGFR (Bcl-xL o MCL-1) 4 días y 21 días después de transducción.

Figura 6

La expresión de MCL1 en combinación con BCL6 y/o de Bcl-xL resulta en el resultado de las células B de memoria humanas. Las células de memoria CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgA⁻ activado se transdujeron con: (a) BCL6-GFP y MCL-1-NGFR, (b) BCL6-GFP y Bcl-xL-NGFR o (c) BCL6-Bcl-xL-GFP y MCL-1-NGFR y d marcadores de transducción fueron seguidos en el tiempo por análisis FACS. Se representa el porcentaje de células transducidas en un cultivo en masa que se mantiene bajo condiciones de cultivo estándar, por ejemplo con células CD40L-L irradiadas y rmlL-21. Las células transducidas con BCL6 en combinación con MCL-1 o Bcl-xL mostraron ventaja de crecimiento en comparación con células que carecen de uno de estos transgenes y en última instancia dominan los cultivos (>90%).

Figura 7

Aumento relativo en la cantidad de células de células B de memoria humanas que expresan MCL1 en combinación con BCL6 y/o Bcl-xL. Como en la Figura 6 se transdujeron células de memoria CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgA⁻ activadas con: (a) BCL6-GFP y MCL-1-NGFR, (b) BCL6-GFP y Bcl-xL-NGFR o (c) BCL6-Bcl-xL-GFP y MCL-1-NGFR y la cantidad de células fue seguida en tiempo mediante conteo. La cantidad de células relativas se determinaron mediante la corrección del porcentaje de células que portan los transgenes de interés, como se muestra en la Figura 6. Las células que expresan BCL6 y MCL-1 crecieron fuera y mostraron una mayor proliferación en comparación con células con BCL6 solo. Sin embargo, la supervivencia y la proliferación fue más profunda para la combinación de BCL6 y Bcl-xL solo o en combinación con MCL-1. Curiosamente, en (c) las células de BCL6 y Bcl-xL que no superan células también contiene MCL-1 que indica que la adición de MCL-1 es una ventaja.

Figura 8

La expansión relativa de la cantidad de células dobles transducidas. Los cultivos de células co-transducidas con BCL6, Bcl-xL y MCL1 tiene lugar 21 días después de transducción y se iniciaron con iguales cantidades de células y se fijaron a 1. Los cultivos de BCL6/Bcl-xL BCL6 /MCL1 son 100% transducidos al doble en día 21. BCL6/Bcl-xL y MCL-1 fue del 86% transducidos al doble en el día 21 y aproximadamente el 96% en el día 43. La expansión de células transducidas con BCL6/Bcl-xL y 1 MCL- es igual a la expansión de células transducidas con BCL6 Bcl xL. La cantidad de células se expande por lo menos hasta el día 43 después de transducción.

Figura 9

El fenotipo de células transducidas con BCL6, Bcl-xL y MCL-1 se basa en la expresión de CD20 y CD38 en el día 4 y 21 después de la transducción. (a) Las células que expresan BCL6 en combinación con MCL-1 y/o Bcl-xL adquieren un centro de células Germinal como fenotipo y tienen (b) IgG de superficie celular (BCR) positivo, similar a las células co-transducidas con BCL6 Bcl-xL. Las células que carecen BCL6 se diferencian hacia las células del tipo plasmablasto con alta expresión de CD38 y reducida expresión de CD20

Ejemplos

Métodos

Aislamiento de células B. Se obtuvieron células B de sangre periférica (capas leucocitarias de Sanquin) por separación de Ficoll y microperlas CD22 MACS (Miltenyi Biotech). Posteriormente se clasificaron estas células para CD19⁺CD3⁻

CD27⁺IgM⁺IgA⁻ (células de memoria de IgG) o CD19⁺CD3⁺CD27⁺IgG⁺IgA⁻ (células de memoria de IgG) en un FACSaria (Becton Dickinson).

Clasificación de células B de amígdalas. Se obtuvieron células B de amígdalas de la amigdalectomía de rutina realizada en el Departamento de Otorrinolaringología en el Centro Médico Académico de Amsterdam, Países Bajos. Separamos las células B por Ficoll y se clasificó la población CD19⁺CD3⁺CD44⁺IgD⁻ GC. El uso de estos tejidos fue aprobado por los comités de ética médica de la institución.

Cultivo celular. Hemos mantenido las células B (2x10⁵ células ml⁻¹) en medio de cultivo IMDM (Gibco) que contiene 8% de FBS (Gibco), penicilina/estreptomicina (Roche) suplementado con IL 21 de ratón recombinante (25 ng ml⁻¹, R&D systems) y se co-cultivaron sobre fibroblastos de células L de ratón γ -irradiadas (50 Gy) que expresan establemente CD40L (células CD40L-L, 10⁵ células ml⁻¹). Hemos probado células rutinariamente por PCR para la presencia de micoplasma y EBV.

Transducción retroviral. Las construcciones retrovirales de BCL6, ID2 e ID3 se describieron anteriormente (Shvarts, A. et al. Genes Dev 16, 681-6 (2002); Jaleco, A.C. et al. Blood 94, 2637-46 (1999); Spits H. et al. J Exp Med 192, 1775-83 (2000)). En resumen, hemos construido vectores bicistrónicos con un gen de interés ligado a un sitio de entrada interno ribosomal corriente abajo (IRES) y un gen marcador que permite la traducción independiente de los productos de ambos genes en las células objetivo transducidas. La secuencia de codificación ID3 se clonó a partir del plásmido pcDNA-Id3 (regalo del Dr. C. Murre, Universidad de California en San Diego, San Diego, CA). El producto se ligó entre el sitio Xho I y SnaBI del poliligador de nuestro plásmido ligador LZRS-IRES-GFP y/o YFP para obtener el vector retroviral LZRS-Id3-IRES-GFP.

La secuencia de codificación de ID2 humana se cortó del vector pSG5-Id2 (un regalo del Dr. R. de Groot, Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos) con NotI y se ligó en el sitio NotI de poliligador de nuestros plásmidos LZRS-ligador - IRES-GFP y/o YFP. Una secuencia de codón optimizado del sitio de fosforilación mutante (S159A) de MCL-1 humano (Maurer, U. et al. Mol Cell 21, 749-760 (2006)) se ordenó de GeneArt (Regensburg Alemania) y clonó en el vector retroviral LZRS. El cADN de Bcl-xL humano se clonó en los vectores retrovirales LZRS y retrovirus recombinantes sin auxiliares se produjeron después de transfección en una estirpe celular de empaquetamiento retroviral anfitrión basada en 293T, Phoenix (Kinsella, T.M. et al. Hum Gene Ther 7, 1405-1413 (1996)). Las células B de memoria humanas fueron co-transducidas por los diferentes retrovirus después de la activación sobre las células CD40L-L en presencia de rmlL-21 durante 36 horas como antes (Diehl, S.A. et al. J Immunol 180, 4805-15 (2008)), pero se centrifugaron en las células de adición y virus a temperatura ambiente durante 60 min a 360 xg (1.800 RPM).

Citometría de flujo. Se analizaron las células teñidas en una LSRII (BD) y datos de citometría de flujo procesados con el software FlowJo (Tree Star). Compramos los siguientes mAbs contra las moléculas humanas de BD-Pharmingen a menos que se indique lo contrario CD3 (SK7), CD10 (HI10a), CD19 (SJ25C1), CD20 (B9E9; Beckman Coulter), CD21 (B-ly4), CD22 (B-ly8; IQ Products), CD25 (BC96; eBioscience), CD27 (O323; eBioscience), CD30 (BerH8), CD38 (HB7), CD40 (MAB89; Beckman Coulter), CD70 (Ki24), CD71 (YDJ1.2.2; Beckman Coulter), CD80 (L307.4), CD86 (2331), CD95 (DX2), CD132 (TUGh4), CD184 (CXCR4, 12G5), CD271 (LNGFR; ME20.4-1.H4; Miltenyi Biotech), CD275 (MIH12; eBioscience), HLA-DR (L243), IgA (F(ab)2; DAKO), IgD (IA6-2), IgG (G18-145), IgM (G20-127) (BD), IL-21R (152512; R&D systems), Ig-kappa (F(ab)2; DAKO, G20-193), e Ig-lambda (F(ab)2; JDC12, DAKO).

RT-PCR. Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa con un BioRad iCycler y se utilizó el método de 2-($\Delta\Delta$ CT) para calcular los niveles relativos de expresión de ARNm normalizados con actina. Se describen cebadores para AICDA (codificación AID) (Smit, L.A. et al. Cancer Res 63, 3894-8 (2003))

ELISA. Recubrimos placas recubiertas con fragmento Fc de IgG anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 5 μ g ml⁻¹ en PBS durante 1 h a 37°C u o/n a 4°C y se lavaron en tampón de lavado ELISA (PBS, Tween-20 al 0.5 %). 4% de leche en PBS se utilizó como agente de bloqueo, antes de agregar diluciones seriadas de los sobrenadantes de cultivo celular y Abs de detección conjugados con HRP (diluciones 1:2500 para anticuerpo de IgG conjugado con HRP (Jackson) Se utilizó la solución de sustrato TMB (Biosource) para desarrollo de las pruebas ELISA.

Clonación y secuenciación de mutantes de D25. Se aislaron ARN total utilizando el kit RNeasy® Mini (Qiagen), ADNc generado y se realizó la PCR VH1-69 para determinar la secuencia de los subclones D25. A partir de clones interesantes (#29, #59, #77, #189) la región variable de cadena pesada se clonó en el vector de clonación pCR2.1TA (Invitrogen). Para descartar la transcriptasa o la polimerasa de ADN inducida por mutaciones inversas, hemos realizado diversos experimentos de clonación independientes. Para producir mAb D25 recombinante hemos clonado mutado regiones variables pesada y ligera originales mutadas con D25 en marco con las regiones constantes kappa e IgG1 humana y en un vector basado en pcDNA3.1 (Invitrogen) y células 293T transfectadas transitoriamente. También se determinaron las secuencias de VL de subclones D25, pero no albergan mutaciones en comparación con la secuencia de cadena ligera D25 originales. Se purificaron D25 recombinante a partir del sobrenadante de cultivo con Proteína A.

Resultados

Células B de memoria periféricas humanas transducidas con células B del tipo GC semejantes a BCL6 y Bcl-xL

Hemos demostrado que la sobreexpresión de BCL6 y Bcl-xL (que se expresan en células B del centro germinal (GC) y están bajo el control de STAT5 (Scheeren, F.A. et al. *Nat Immunol* 6, 303-13 (2005); PCT/NL2008/050333)) se sinergizan para aumentar el potencial de proliferación y supervivencia de las células B de memoria humana in vitro cuando se cultivan sobre células L que expresan CD40L (células CD40L-L) en presencia de IL 21. Las células B humanas normales rápidamente se diferencian células de plasma que producen anticuerpos cuando se cultivan en células CD40L-L en presencia de IL 21 (Ettinger, R. et al. *J Immunol* 175, 7867-79 (2005)) que se acompaña de una disminución de la expresión de BCR de superficie y MHC clase II y un aumento en la expresión de CD38 (Liu, Y.J. & Arpin, C. *Immunol Rev* 156, 111-26 (1997)). En contraste con las células no transducidas o células que expresan solo Bcl-xL en el mismo cultivo, solo BCL6 y células BCL6+Bcl-xL que retienen expresión de BCR y en las que el intermedio HLA-DR^{high}CD38 (Figura 1a) confirma que el BCL6 inhibe la diferenciación de células B (Scheeren, F.A. et al. *Nat Immunol* 6, 303-13 (2005); Diehl, S.A. et al. *J Immunol* 180, 4805-15 (2008)).

Las células B positivas BCL6+Bcl-xL expandidas con CD40L e IL 21 expresan CD19, CD20, CD21 y CD22, los marcadores de activación CD25, CD30, CD70, CD80, CD86, CD95, ICOSL, y los receptores de citoquinas CD132 (γc) e IL-21R. Estas células expresan CD38 y CD20 a niveles equivalentes a las células GC de las amígdalas. La expresión de CD27, CXCR4, CD71, CD10 y HLA-DR en células transducidas es consistentemente mayor en comparación con las células recién aisladas GC de las amígdalas (Figura 1A), que puede ser debido al estado de activación y el aumento de tamaño de la célula.

Las células BCL6+Bcl-xL transducidas expresan A/CDA (que codifica el AID de la enzima) en niveles comparables a aquellos expresados por las células B de GC recién aisladas (Figura 1b). Como se muestra abajo, la AID es funcional en estas células ya que se indujo SHM en los genes de Ig de las células B expandidas. Puesto que la AID no se expresa en células de memoria de sangre periférica (Figura 1B) o células de plasma (Muramatsu, M. et al. *J Biol Chem* 274, 18470-6 (1999)), y las células transducidas mostraron que la expresión de marcadores de superficie celular típicos de GC, nuestros resultados demuestran que la expresión BCL6 y Bcl-xL en combinación con señalización CD40L e IL 21 confieren características del tipo GC a las células B de memoria CD27+ humanas.

25 D25 y mutantes D25 de anticuerpo anti-RSV

Las células B transducidas con BCL6+Bcl-xL secretan cantidades relativamente altas de anticuerpos. De esta manera podemos seleccionar las células B específicas de antígeno sobre la base de la secreción de anticuerpos específicos. Elegimos el virus respiratorio sincitial patógeno (RSV) como la fracción antigénica. El RSV es la causa más frecuente de bronquiolitis y neumonía en los lactantes y niños menores de 1 año de edad y es un serio problema de salud para las personas de edad avanzada (Thompson, W.W. et al. *JAMA* 289, 179-86 (2003); Hall C.B. et al. *NEMJ* 360, 588-599 (2009)). Salón CB et al. *NEMJ* 360, 588-599 (2009)). Las células B de memoria BCL6+Bcl-xL transducidas de un donante sano se expandieron con células CD40L-L e IL 21 y se cribaron para la presencia de anticuerpos que neutralizan RSV en un experimento de microneutralización (Johnson, S. et al. *J Infect Dis* 180, 35-40 (1999)). Uno de los anticuerpos, D25, con la más alta actividad neutralizante se clonó por dilución limitante y se caracterizó adicionalmente (PCT/NL2008/050333). Hemos observado concentraciones inhibitorias medio máximas medianas (IC50) contra el virus RSV-A2 en el rango de 2.1 ng ml⁻¹. Antes se estudió la actividad funcional de AID en la estirpe celular D25 analizamos la expresión AICDA en 23 estirpes celulares monoclonales mediante PCR en tiempo real. La expresión de AID en estas estirpes celulares fue variable. Diversos clones expresaron niveles similares a las células B GC de amígdalas, mientras que otros eran AICDA baja (Figura 2b). Para determinar si AID es funcional en los clones de células B, se subclonó la estirpe de célula B monoclonal específica a RSV mediante clasificación única de células y se analizaron sus genes VH para la presencia de mutaciones. Sesenta y tres por ciento de los pozos que se sembraron con una célula mostraron fuerte expansión, que muestra que la expresión de AID no conduce a la inestabilidad genética masiva que conduce a la detención del crecimiento y muerte celular. Después de 3 semanas se cosechó el sobrenadante de cultivo de 108 subclones y el ARN de las células aisladas. Posteriormente se generó ADNc y la región VH se secuenció. El análisis de secuencia reveló un total de 184 mutaciones de VH (107 mutaciones únicas, Figura 2a), lo que resulta en una tasa de mutación estimada entre 8.85×10^{-5} y 5.14×10^{-5} mutaciones por pb por división celular, que está en el extremo inferior de la tasa de mutación mediada por AID in vivo (10^{-3} a 10^{-5}) (Peled, J.U. et al. *Annu Rev Immunol* 26, 481-511 (2008)). Los genes VH de los subclones individuales muestran una cantidad variable de mutaciones con 65% de subclones que albergan una a tres mutaciones en su región VH (de los cuales 23% son mutaciones silenciosas) y 11% albergan más de tres mutaciones de VH. Veinte y cuatro por ciento de los clones no tenían mutaciones de VH (Figura 2C). El gel VH de 372 pares de bases de D25 contiene 26 puntos de acceso mutacionales de AID (RGYWWRVCY) que representan el 30% de las mutaciones totales. Las mutaciones se observaron predominantemente en las regiones CDR y FR3 (Figura 2d).

Mientras que los sobrenadantes de la mayoría de los subclones D25 unidos a células HEp2 infectadas por RSV similares a D25 recombinante, algunos de esos clones se unen ya sea menos o más que diferente de D25 (Figura 2e). Las diferencias en las actividades de unión se asocian con mutaciones en las regiones VH.

Regulación de la expresión AID en células B BCL6+Bcl-xL transducidas

Para algunas aplicaciones, es deseable inhibir la AID para evitar la acumulación de mutaciones en los genes de Ig de clones de células B transducidas con BCL6+Bcl-XL. Para lograr esto tomamos ventaja del hecho de que la AID es regulada por el factor transcripción E47 de hélice-bucle- hélice básico (Sayegh, C.E., et al. *Nat Immunol* 4, 586-93

(2003)). Se sobreexpresan los inhibidores del factor de hélice bucle hélice de la unión de ADN ID2 y ID3 que son conocidos por formar complejos transcripcionalmente inactivos con E47, inhibiendo de este modo la expresión de AID (Sayegh, CE, et al. *Nat Immunol* 4, 586-93 (2003)). Como se muestra en la Figura 3a, la sobreexpresión de ambos ID2 e ID3 redujo fuertemente los niveles de AICDA en la estirpe celular D25. La proliferación de la estirpe celular se redujo cuando se expresó ID2 pero no cuando se expresó ID3 (Figura 3b). La sobreexpresión de AID también reduce la capacidad proliferativa de las células D25. Como era de esperar, la sobreexpresión de AID mejora fuertemente la expresión de AID (Figura 3a). De este modo la modulación de los niveles de ID2 y/o ID3 proporciona un método para modular las mutaciones inducidas por AID en células B transducidas BCL6+BclxL.

La función de D25 se ve alterada por la sustitución de aminoácidos debido a la actividad AID

Nos preguntamos si podríamos encontrar nuevos subclones de D25 que muestren una función alterada. Sin embargo, ya que la afinidad de D25 para el objetivo putativo, la proteína de fusión de RSV (F) ya es alta y D25 neutraliza RSV ya a baja concentración era difícil encontrar clones que serían mejores de D25 en sí mismo. No obstante hemos probado el sobrenadante de cultivo de células B de los subclones D25 dos veces para unión a células HEp2 infectadas por RSV y una vez para la competencia con D25 marcado con PE. Estos experimentos dieron resultados variables (datos no mostrados), pero cuando todos los 25 anticuerpos superiores de cada conjunto de datos se compararon con las secuencias de VH apareció algo de la posición de aminoácido muy interesante. Varios subclones D25 se produjeron como proteínas recombinantes de las que el clon #59 todavía tenía la misma configuración que el clon D25 original, #77 contenía una mutación muy típica en la posición 107 (E107K), que parece provocar una unión reducida a células HEp2 infectados por RSV ya que otros clones que han perdido la unión a las células HEp2 infectadas también reunieron esta mutación. Adicionalmente el clon # 29 (S83Y/V111I/V112L) y #189 (G63D/V111I/V112L) comparten una mutación en la posición 111 y 112 (V → I y V → L). Estos dos clones reemplazan el anticuerpo D25 original a partir de la unión a las células HEp2 infectadas por RSV (Figura 4a) de una manera dependiente de dosis, mientras que D25 por sí mismo y el anticuerpo no vinculante no pueden sustituir el anticuerpo D25 marcado con PE. Además en una competición directa los dos clones #29 y #189 de nuevo reducen la unión de la inmunoglobulina D25 original (Figura 4b). Así, mediante la expresión de AID en nuestra estirpes de célula B BCL6+Bcl-xL realizamos in vitro maduración de afinidad de anticuerpos dentro de la de células B originales.

Expresión del gen antiapoptótico MCL-1 solo o en combinación con BCL6 y/o Bcl-xL aumenta la supervivencia y proliferación de células B humanas

Dado que los cultivos de células B con solo BCL6 y coestimulados con CD40L e IL-21 muestran un bloque en la diferenciación hacia plasmablastos, pero carecen de las señales para mejorar la supervivencia y la proliferación, se estudiaron además de Bcl-xL también la función de la molécula antiapoptótica MCL-1 en este proceso. Cuando las células de memoria D19+CD27+IgM-IgA se transdujeron con: (i) BCL6-GFP y MCL-1-NGFR, o (ii) BCL6-GFP y Bcl-xL-NGFR o (iii) BCL6-Bcl-xL-GFP y MCL-1-NGFR (Figura 5), todos ellos mostraron una mayor supervivencia. Las células que contienen BCL6 MCL-1 proliferaron 3 veces más lento en comparación con las células que contienen BCL6 y Bcl-xL o BCL6, Bcl-xL y MCL-1 (Figuras 6, 7 y 8). Como el Bcl-xL, MCL-1 no interfiere con la función de BCL6, a saber, el bloque en la diferenciación hacia plasmablasto y estas células co-transducidas de hecho todavía poseen un centro fenotipo Germinal (CD20+CD38+) (Figura 9A) y también todavía expresan una inmunoglobulina expresada en superficie (Figura 9B). Se espera que la expresión de AID en células transducidas con MCL1 BCL6 y/o Bcl-xL no sea alterado.

Regulación de la expresión de AID en células B transducidas con BCL6+ Mcl1

Como se mostró anteriormente para los clones de células B transducidas con BCL6+ Bcl-XL, también se sobreexpresan ID2 e ID3 en células B transducidas con BCL6+Mcl-1, inhibiendo de esta manera la expresión de AID (Sayegh, CE, et al. *Nat Immunol* 4, 586-93 (2003)). Posteriormente, se demuestra, por ejemplo mediante el uso de RT-PCR cuantitativa, que la sobreexpresión de ambos ID2 e ID3 reduce los niveles de AICDA en estas células. Por lo tanto aumentar los niveles de ID2 y/o ID3 proporciona un método para evitar mutaciones inducidas por AID en células B transducidas con BCL6+Mcl-1.

Los procedimientos se describen en la sección "Métodos" anterior.

Referencias

Adams J.M. et al. *Current Opinion in Immunology* 19, 488-496 (2007)

Banchereau J et al. *Science* 251, 70-72 (1991)

Baron, U. and Bujard, H. *Methods Enzymol* 327, 401-21 (2000)

Boise, L. H. et al. *Cell* 74, 597-608 (1993)

Chipuk, J.E. et al. *Trends in Cell Biol* 18, 157-163 (2007)

Christopherson, K.S. et al. *PNAS* 89, 6314-8 (1992)

Close, P.M., et al. *J Pathol* 162, 209-16 (1990)

- Diehl, S.A. et al. J Immunol 180, 4805-15 (2008)
- Ettinger, R. et al. J Immunol 175, 7867-79 (2005)
- Good, K.L et al. J Immunol 177, 5236-47 (2006)
- Gossen, M. and Bujard, H. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 5547-51 (1992)
- 5 Gossen, M. et al. Science 268, 1766-9 (1995)
- Guzman, L. M. et al. Bacteriol 177, 4121-4130 (1995)
- Hall C.B. et al. NEMJ 360, 588-599 (2009)
- Ichikawa H.T. et al. J Immunol 177, 355-361 (2006)
- Johnson, S. et al. J Infect Dis 180, 35-40 (1999)
- 10 Kee B.L. Nat Rev Immunol 9, 175-84 (2009)
- Kinsella, T.M. et al Hum Gene Ther 7, 1405-1413 (1996)
- Kuo, T.C. et al. J Exp Med 204, 819-830 (2007)
- Liu, Y.J. & Arpin, C. Immunol Rev 156, 111-26 (1997)
- Maurer, U. et al. Mol Cell 21, 749-760 (2006)
- 15 Muramatsu, M. et al. J Biol Chem 274, 18470-6 (1999)
- Peled, J.U. et al. Annu Rev Immunol 26, 481-511 (2008)
- Rousset F et al. PNAS 89, 1890-1893 (1992)
- Sayegh, C.E., et al. Nat Immunol 4, 586-93 (2003)
- Scheeren, F.A. et al. Nat Immunol 6, 303-13 (2005)
- 20 Sidwell, R.W. & Barnard, D.L. Antiviral Res 71, 379-90 (2006)
- Smit, L.A. et al. Cancer Res 63, 3894-8 (2003)
- Spits H. et al. J Exp Med 192, 1775-83 (2000)
- Tan S et al. PNAS 100, 11997-12002 (2003)
- Thompson, W.W. et al. JAMA 289, 179-86 (2003)
- 25 Zamore et al. Cell 101, 25-33 (2000)

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para modular la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en una célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto, que comprende:
transducir una célula B con una molécula de ácido nucleico que codifica BCL6 y
- 5 transducir dicha célula B con una molécula de ácido nucleico antiapoptótica de la familia Bcl-2, generando de esta manera un célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto;
en la que el método comprende adicionalmente proporcionar dicha célula B con IL21 y CD40L; y
- obtener inmunoglobulinas que albergan mutaciones que no están presentes en la célula B antes de la transducción con BCL6 y dicha molécula de ácido nucleico antiapoptótica.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha célula B es una célula B de memoria, preferiblemente una célula B de memoria humana.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ácido nucleico antiapoptótico comprende Bcl-xL o Mcl-1, o una parte funcional de las mismas.
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende reducir la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en dicha célula B al reducir la actividad funcional de la citidina desaminasa inducida por activación (AID) en dicha célula B.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se reduce la actividad funcional de citidina desaminasa inducida por activación (AID) al reducir la expresión y/o actividad específica de la citidina desaminasa inducida por activación (AID) en dicha célula B.
- 20 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la expresión de la citidina desaminasa inducida por activación (AID) se modula por la expresión del inhibidor de unión de ADN (ID) en dicha célula B.
7. Un anticuerpo aislado o recombinante que produce una célula B que expresa:
- Bcl-6, y
- 25 - un ácido nucleico antiapoptótico de la familia Bcl-2, e
- inhibidor de unión de ADN (ID).
8. Una célula B que produce un anticuerpo aislado o recombinante de acuerdo con la reivindicación 7,
en el que dicho ácido nucleico antiapoptótico comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de Bcl-xL y Mcl-1 y una parte funcional de Bcl-xL y una parte funcional de Mcl-1.
- 30 9. Una célula B de memoria recombinante que comprende:
- Bcl-6, y
- un ácido nucleico antiapoptótico de la familia Bcl-2, y
- un ácido nucleico antisentido o ribozima dirigida contra la proteína de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) E12 y/o E47, que evita que el ARNm de E12 y/o E47 mRNA sea traducido en la proteína.
- 35 10. Un anticuerpo recombinante que produce una célula B de tipo plasmablasto que comprende:
- Bcl-6, y
- un ácido nucleico antiapoptótico de la familia Bcl-2, y
- una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una citidina desaminasa inducida por activación (AID) adicional.
- 40 11. Uso de una célula B que produce anticuerpo del tipo plasmablasto con expresión reducida y/o actividad de citidina desaminasa inducida por activación (AID) y por lo tanto reduce la ocurrencia de hipermutaciones somáticas en dicha célula B para producción a gran escala de anticuerpos.

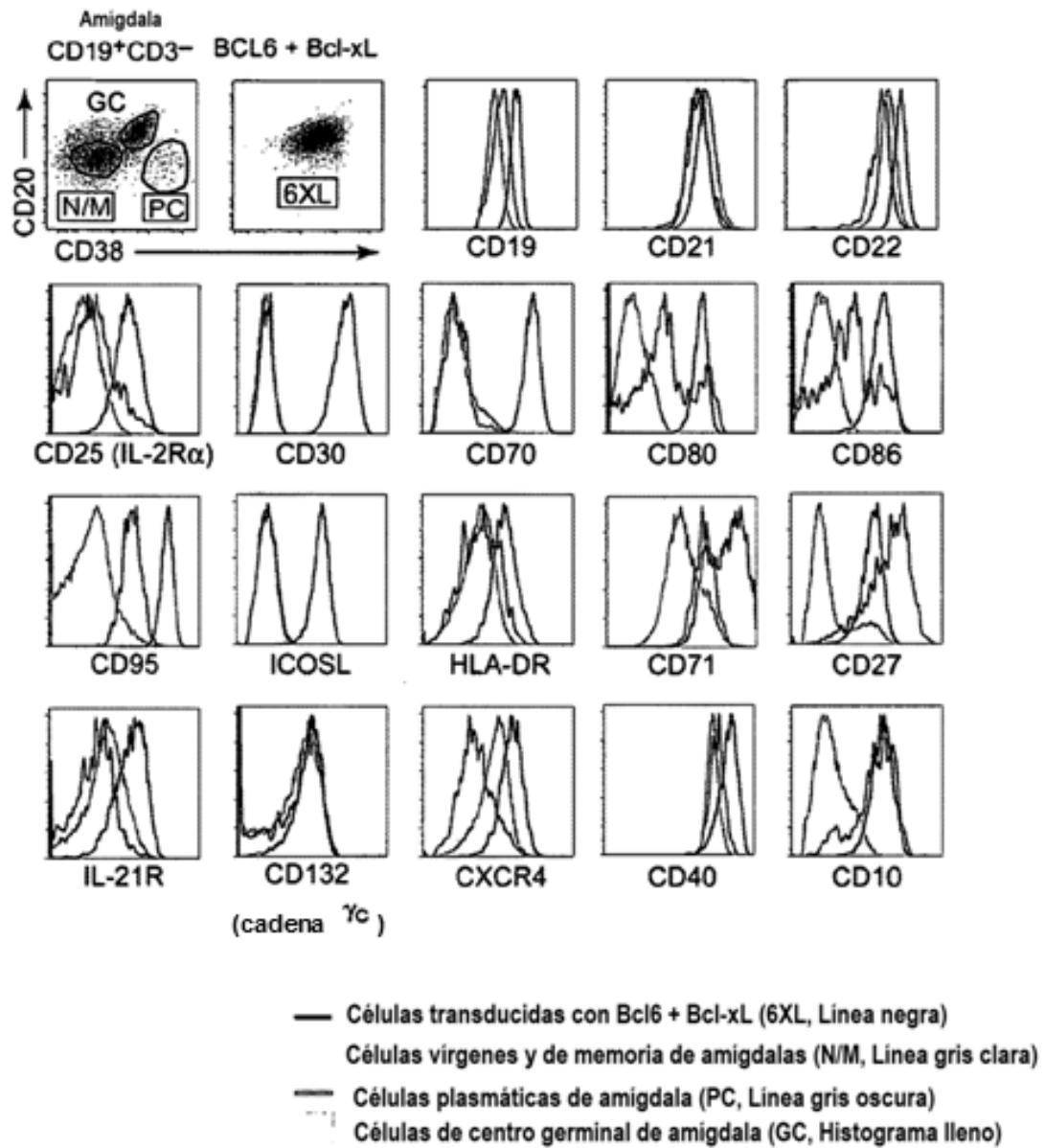


FIG. 1a

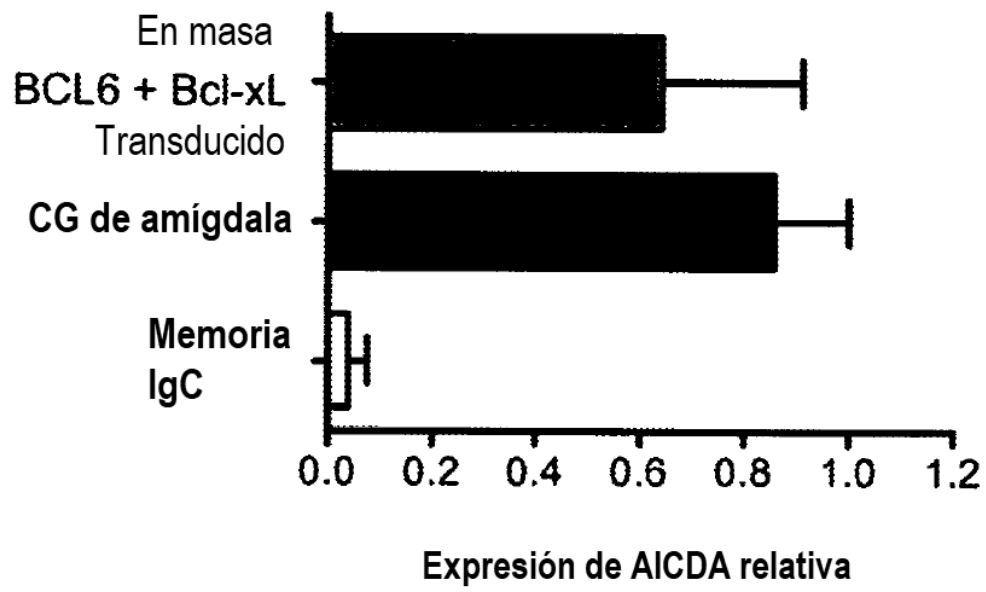


FIG.1b

FIG. 2a

```

-----FR1-----|-----CDR1-----|-----FR2-----|-----CDR2-----|-----FR3-----|-----CDR3-----|-----FR4-----|
1  5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130
VH  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1-69 QVQLVQSGA-EVKKPGSSVRVSKAGGTF-----SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPI--FGTANYAQRFQ--GRVTITADESTSTAYMELSSLKSEDTAVYICARDTNMWSVTYLPHYFDYWGOGTLVTYSS
D25 -----N-----Q-----PL-----RN-I-N-L-----V-L-V-H-P-----D-I-H-I-----H-----TE-L-----N-----N-----
#3  -----L-----I-----G-----
#4  -----L-----I-----G-----
#12 -----L-----I-----G-----
#15 -----L-----I-----G-----
#16 -----L-----I-----G-----
#23 -----L-----I-----G-----
#29 -----L-----I-----G-----
#37 -----L-----I-----G-----
#40 -----L-----I-----G-----
#49 -----L-----I-----G-----
#52 -----L-----I-----G-----
#59 -----L-----I-----G-----
#76 -----L-----I-----G-----
#82 -----L-----I-----G-----
#83 -----L-----I-----G-----
#84 -----L-----I-----G-----
#93 -----L-----I-----G-----
#94 -----L-----I-----G-----
#99 -----L-----I-----G-----
#111 -----L-----I-----G-----
#123 -----L-----I-----G-----
#124 -----L-----I-----G-----
#126 -----L-----I-----G-----
#133 -----L-----I-----G-----
#137 -----L-----I-----G-----
#138 -----L-----I-----G-----
#142 -----L-----I-----G-----
#148 -----L-----I-----G-----
#169 -----L-----I-----G-----
#171 -----L-----I-----G-----
#174 -----L-----I-----G-----
#179 -----L-----I-----G-----
#189 -----L-----I-----G-----
#13 -----L-----I-----G-----
#18 -----L-----I-----G-----
#55 -----L-----I-----G-----
#67 -----L-----I-----G-----
#182 -----L-----I-----G-----

```

FIG. 2a, continuación

SIN AGLUTINANTES:
 #58 -----Y-----P--A-----I-----
 #70 -----K-----T-----L-----
 #77 -----Y-----Y-----K-----
 #78 -----L-----L-----K-----
 #129 -----V-----V-----K-----
 #141 -----R-----R-----K-----
 #149 -----I-----I-----K-----

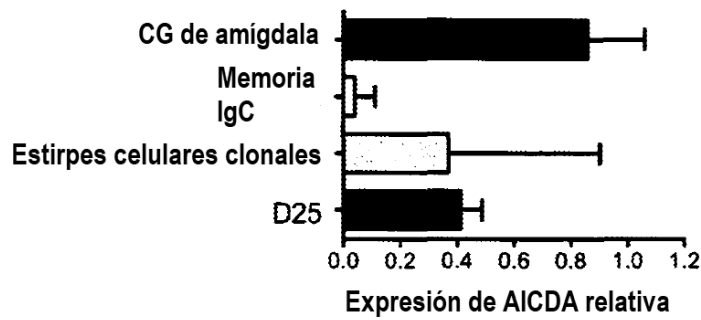


FIG. 2b

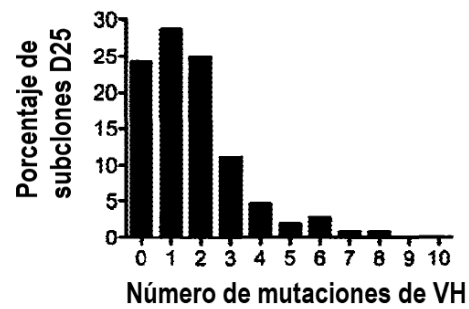


FIG. 2c

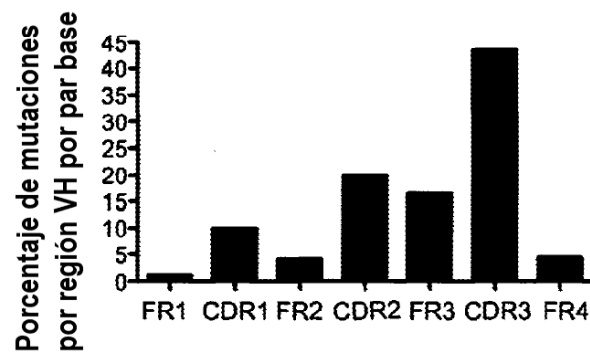


FIG. 2d

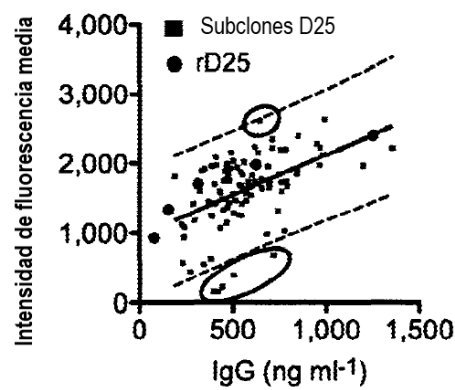


FIG. 2e

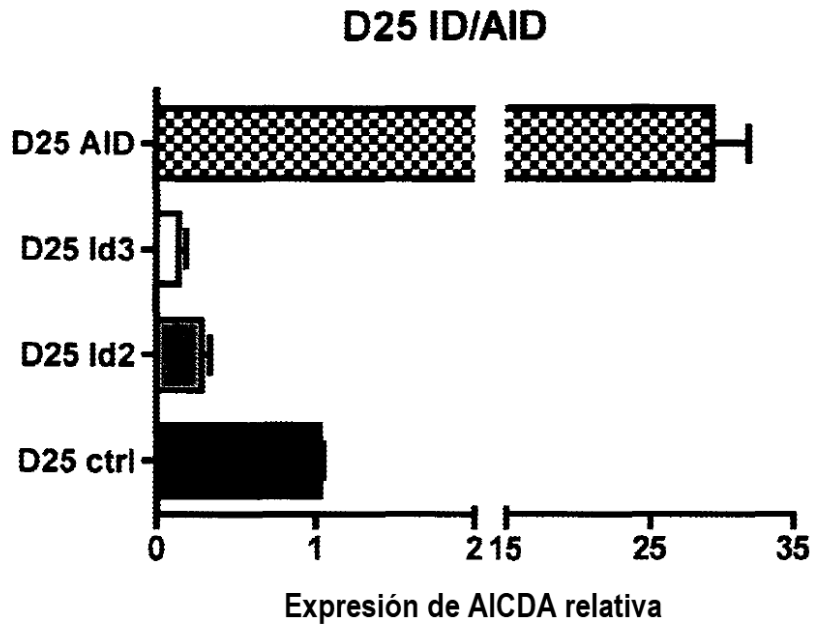


FIG.3a

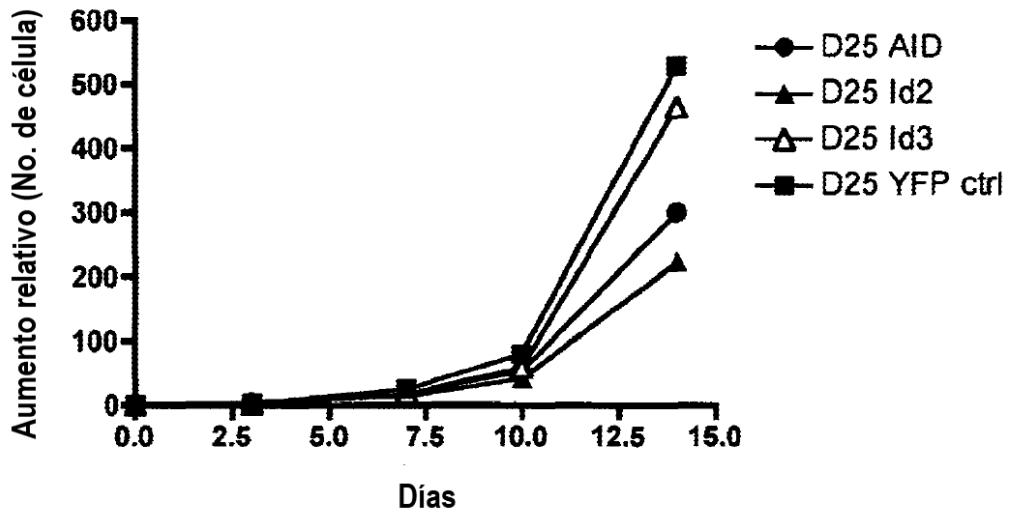


FIG.3b

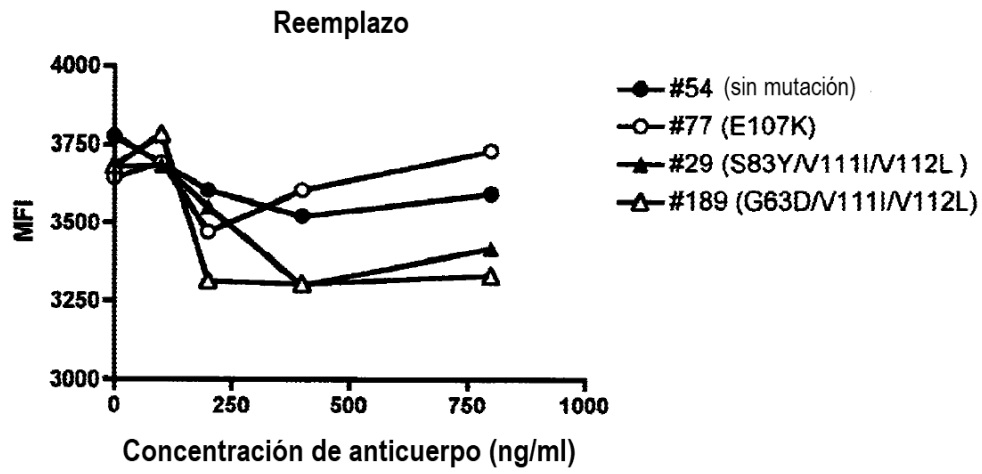


FIG.4a

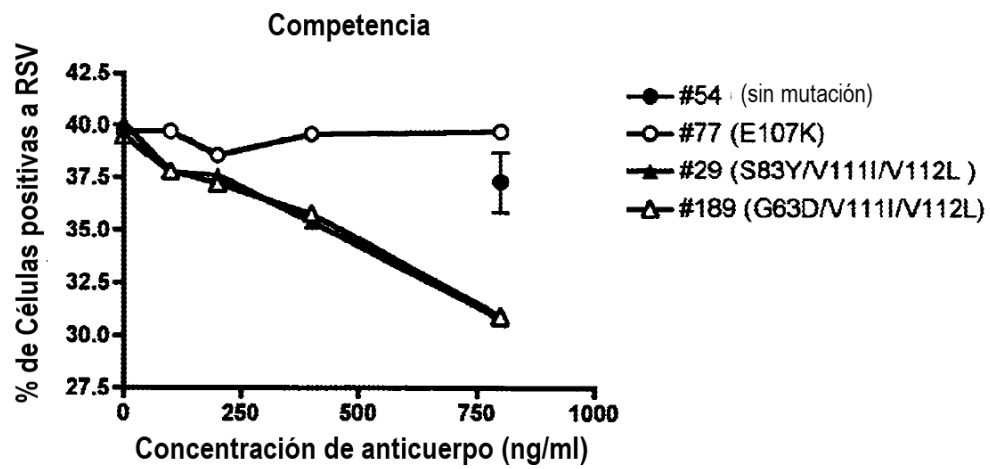


FIG.4b

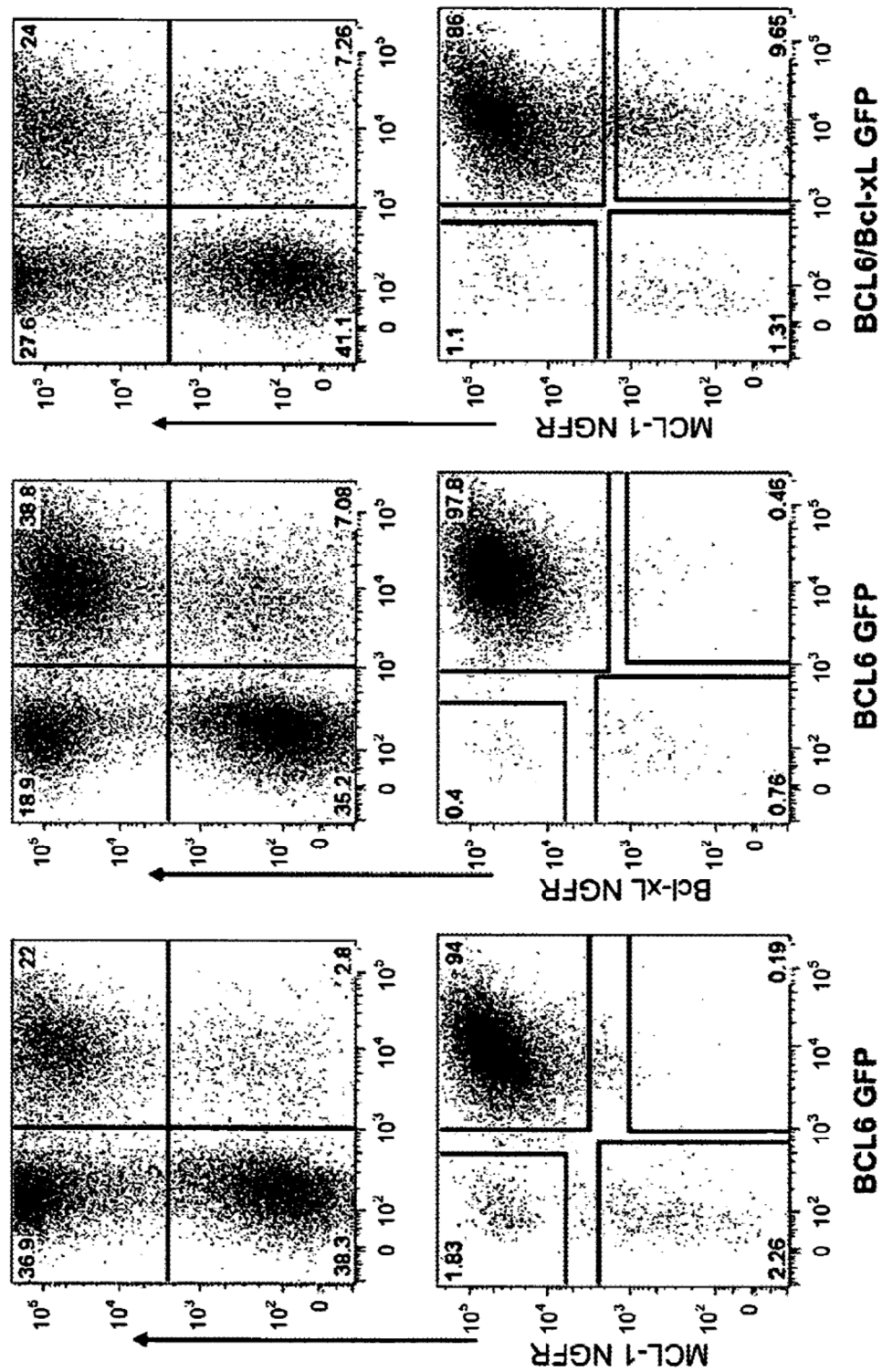


FIG. 5

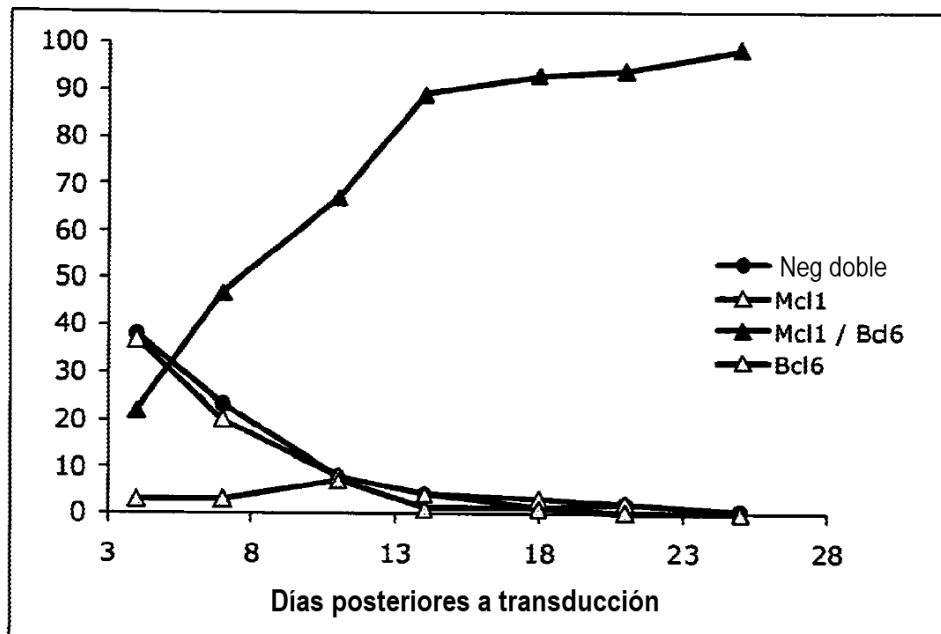


FIG.6a

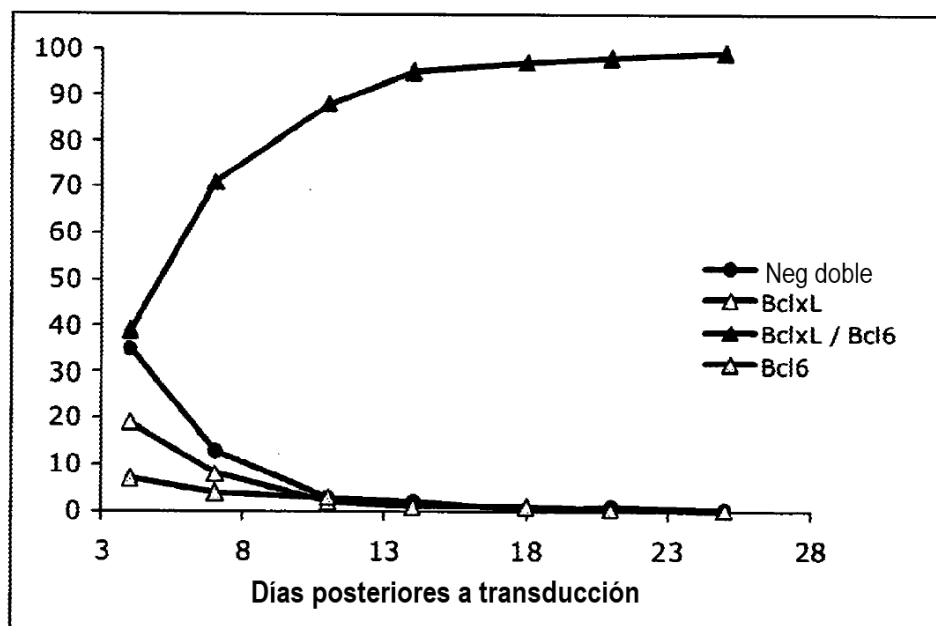


FIG.6b

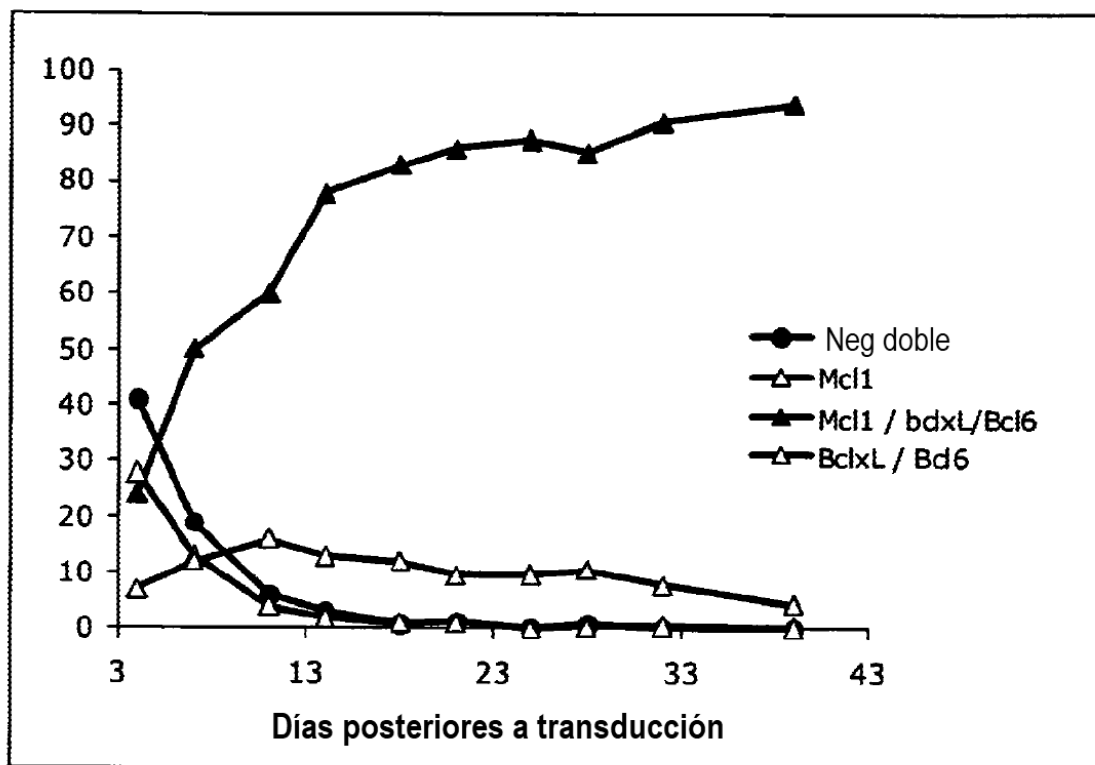


FIG.6c

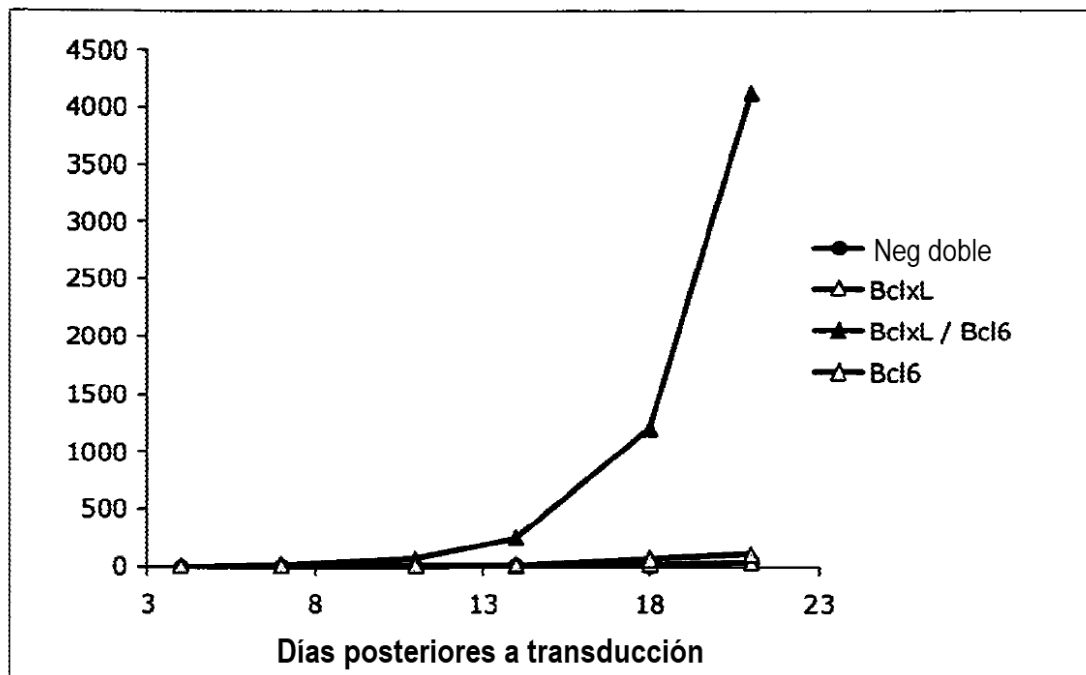


FIG.7a

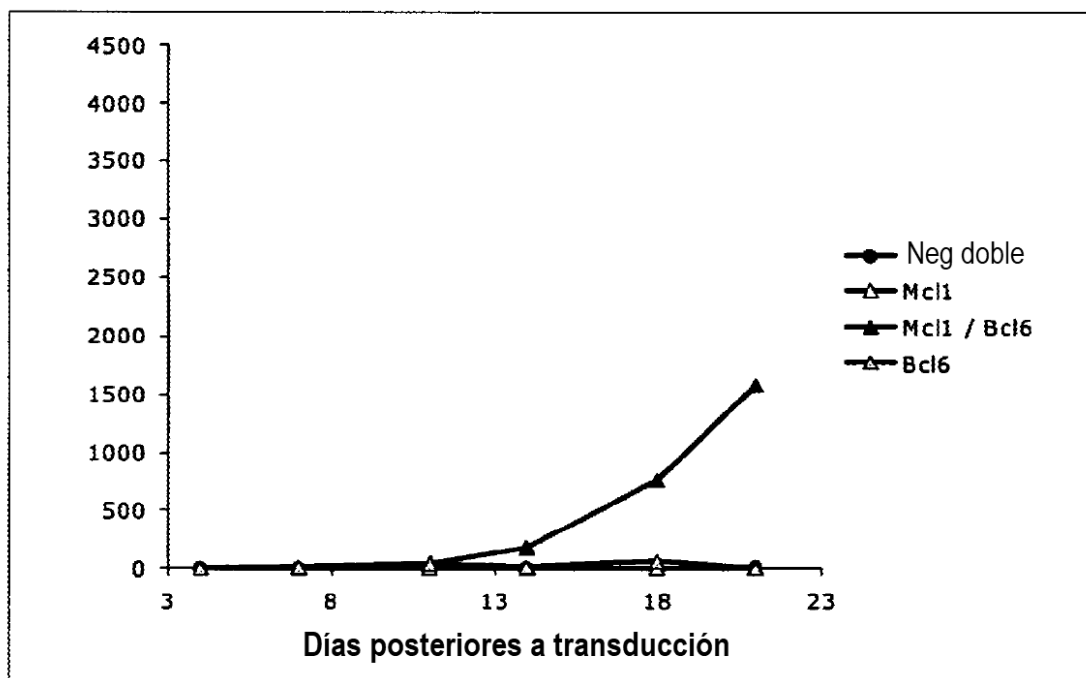


FIG.7b

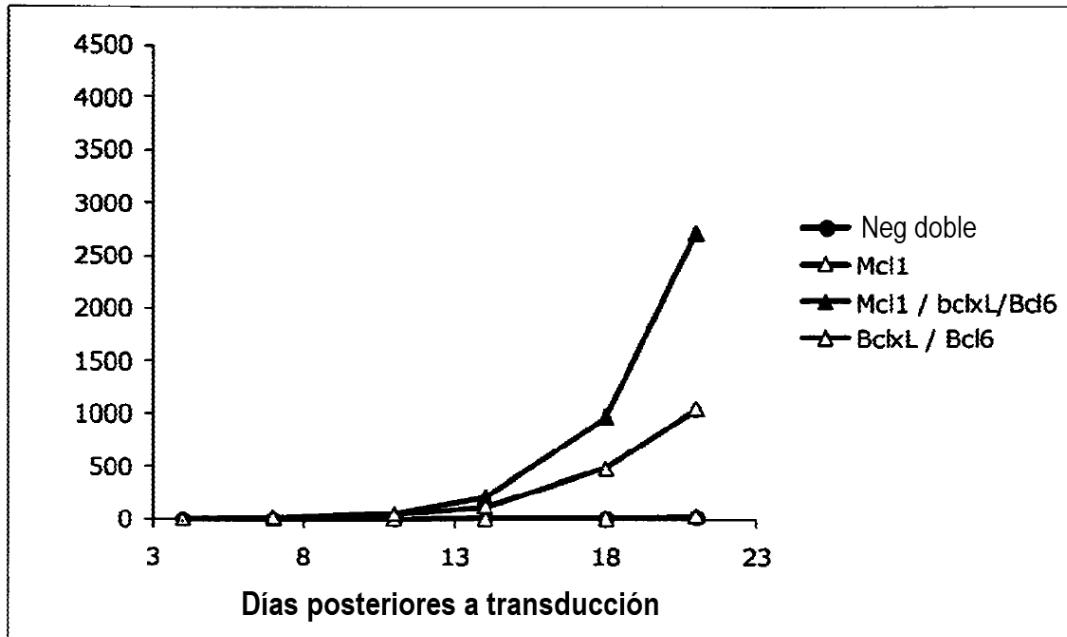


FIG.7c

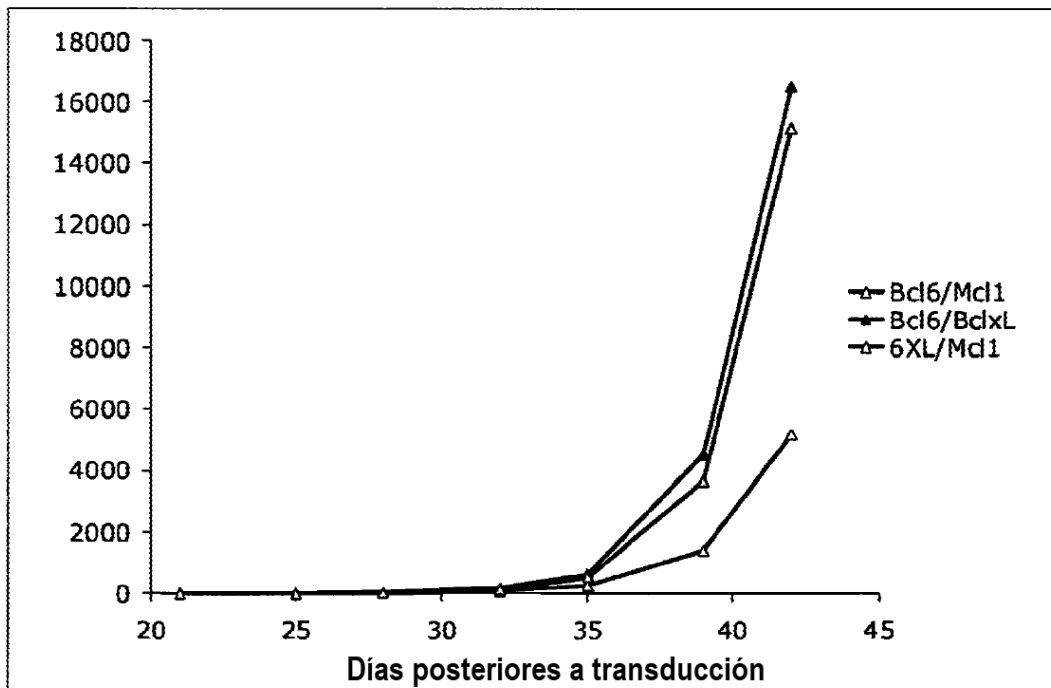


FIG.8

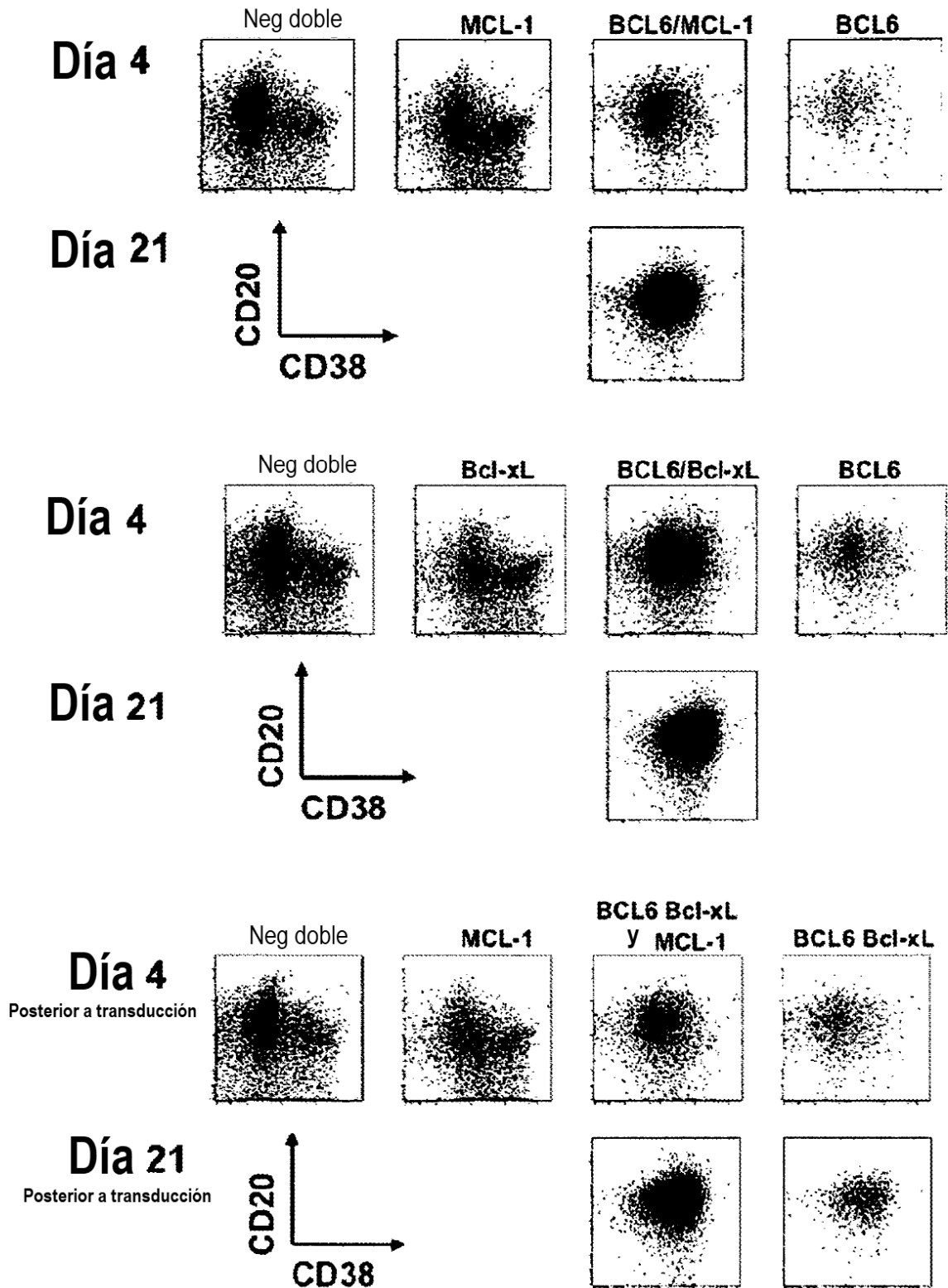


FIG.9a

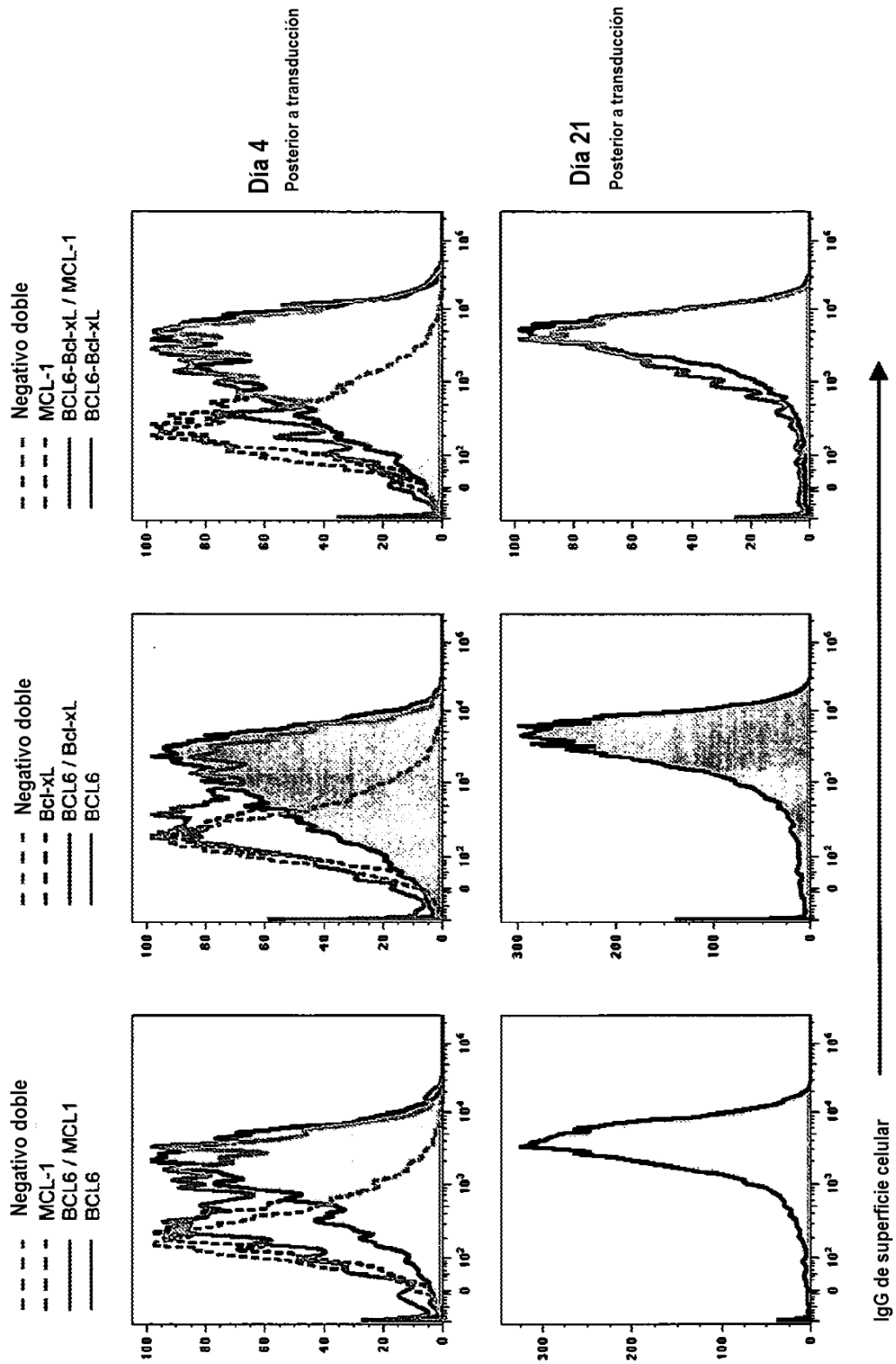


FIG. 9B