

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 104**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C12N 5/0781	(2010.01)
C12N 15/13	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2013 PCT/EP2013/050026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2013 E 13700002 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2797951**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de anticuerpos humanos**

30 Prioridad:

28.12.2011 US 201161580837 P
28.12.2011 EP 11195952

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2018

73 Titular/es:

IMMUNOQUIRE AG (100.0%)
Königsallee 90
40212 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

HAYDAY, ADRIAN;
KROHN, KAI;
RANKI, ANNAMARI;
PETERSON, PÄRT;
KISAND, KAI;
STUART, EDWARD y
MACAGNO, ANNALISA

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 668 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de aislamiento de anticuerpos humanos

5 **Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para producir anticuerpos humanos recombinantes con especificidad deseada derivada de células B humanas. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de anticuerpos humanos a partir de células B de memoria obtenidas de pacientes que sufren de una enfermedad que es causada por o implica la activación del sistema inmunitario, por ejemplo trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Antecedentes de la invención

15 [0002] La inmunoterapia ha despertado un gran interés en la terapia de sustancialmente todas las enfermedades que pueden ser dirigidas a un antígeno no deseado, por ejemplo un patógeno, antígeno tumoral, factores de crecimiento o agregados de proteínas patológicas. Por otro lado, las respuestas de anticuerpos en un sujeto pueden ser la causa de una enfermedad, por ejemplo, en trastornos autoinmunes y algunos trastornos inflamatorios, donde los autoanticuerpos por alguna razón atacan proteínas, células y tejidos endógenos.

20 [0003] En las últimas décadas varias tecnologías han sido desarrolladas para aislar anticuerpos monoclonales y para producir anticuerpos humanizados o completamente humanos; véase, por ejemplo, las referencias citadas en la solicitud internacional WO 2007/068758 también concedida como patente europea EP 1 974 020 B1, en particular en las secciones [0002] a [0027].

25 [0004] Típicamente, el aislamiento de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, a partir de células B se basa en la clonación y expresión de los genes de inmunoglobulina. Esto se puede hacer mediante el uso de bibliotecas de expresión de fagos de genes de V_H y V_L revueltos de células B o mediante el aislamiento de genes de V_H y V_L emparejados de células B individuales utilizando PCR de una sola célula o a partir de clones de células B inmortalizadas.

30 [0005] Hasta ahora, la técnica anterior se dirigía a proporcionar procedimientos para establecer procesos más optimizados en los que un análisis de alto rendimiento de los anticuerpos secretados se puede realizar en la población más grande posible de líneas celulares inmortalizadas que secretan anticuerpos mantenidas en condiciones de cultivo celular. En este contexto, se investigaron varios medios y procedimientos con el fin de mejorar la eficiencia de la inmortalización por EBV y de la clonación celular de células inmortalizadas por EBV; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 35 2004/076677 y WO 2007/068758.

40 [0006] Casi todos los procedimientos para la obtención de células inmortalizadas secretoras de anticuerpos se han establecido con linfocitos B de donantes sanos o de pacientes con enfermedades infecciosas, que mostraron reactividad con antígenos virales; véase, por ejemplo, Traggiai et al., Nat. Medicina. 10 (2004), 871-875 y Funaro et al., BMC Biotechnology 8 (2008), 85.

45 [0007] Sin embargo, los procedimientos actuales pueden no ser tan eficientes para el aislamiento de células B de memoria independientes de antígeno de pacientes que experimentan una respuesta inmunitaria aberrante, por ejemplo en trastornos autoinmunes, en los que los subconjuntos de linfocitos B y T se vuelven anérgicos, con tendencia a la apoptosis o en cualquier caso desregulados. Por ejemplo, los distintos subconjuntos de células B maduras que se acumulan con la edad, denominadas células B asociadas con la edad, se han descubierto en ratones, que son únicamente sensibles a estímulos innatos y refractarios a la estimulación por CD40 y BCR; véase, por ejemplo, Hao et al., Blood 118 (2011), 1294-1304. Parecen estar generadas a partir de células B maduras que exhaustivamente se expanden durante la vida del individuo y por lo tanto pueden representar una población de células de linfocitos "agotados". Además, una población IgD⁺ CD27⁻, posiblemente correspondiente a células B de memoria agotadas se acumula en los seres humanos de edad avanzada; véase, por ejemplo, Colonna-Romano et al., Mech. Ageing Dev. 130 (2009), 681-690. Además, se describió que la eficacia de inmortalización de las células B de memoria de pacientes gravemente infectados, tales como pacientes con VIH-1, que típicamente también sufren de enfermedades oportunistas, es significativamente menor que la de donantes no infectados con VIH-1. Este hallazgo se discutió que era debido a la presencia de células B de memoria "agotadas", caracterizadas por la expresión de receptores inhibitorios y bajos niveles de CD21; véase, por ejemplo, Moir et al., Nat. Rev. Immunol. 9 (2009), 235-245. Por las mismas razones, las poblaciones fenotípicamente distintas de células B autorreactivas que se han limitado funcionalmente tras la estimulación y/o muestran una reducción de la viabilidad en condiciones de cultivo celular, se pueden encontrar en una frecuencia aumentada en enfermedades autoinmunes y algunas enfermedades inflamatorias. Se ha demostrado que el reconocimiento de auto-antígenos (Ag) da lugar a una respuesta de IgG disminuida severamente (Detanico et al., J. Immunol 189 (2012), 4.275-4.283; Chumley et al., J. Immunol

169 (2002), 1735-1743). Las células B autorreactivas que se pueden encontrar en pacientes con enfermedades autoinmunes y algunas enfermedades inflamatorias son susceptibles de estar continuamente expuestas a antígenos y, por tanto, anérgicas (Gauld et al, Nat. Immunol. 6 (2005), 1160-1167). Se espera que estas células se limiten funcionalmente tras la estimulación y/o muestren una reducción de la viabilidad en condiciones de cultivo celular.

5

[0008] Por lo tanto, las células B de memoria de los pacientes que sufren de, por ejemplo, enfermedades autoinmunes o inflamatorias, en particular caracterizadas por células B de memoria desreguladas o agotadas y células B menos viables, respectivamente, puede no ser suficientemente susceptible a los protocolos de inmortalización actuales. Sin embargo, estos pacientes debido a su repertorio de inmunoglobulinas madurado durante el transcurso de su enfermedad, pueden proporcionar una valiosa fuente de anticuerpos humanos contra diferentes dianas terapéuticas.

10

[0009] Por consiguiente, sería altamente deseable proporcionar procedimientos para el establecimiento de procesos en los que, mediante la aplicación de medios y condiciones específicas en cultivo de células para la mejora de la viabilidad y el nivel de producción de inmunoglobulina suficiente para la caracterización de células B que secretan inmunoglobulina y clonación del correspondiente repertorio de genes de inmunoglobulina.

15

[0010] Este problema se ha resuelto mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación tal como se ilustra en los ejemplos y figuras.

20

Descripción resumida de la invención

[0011] La presente invención se basa en la observación de que con el fin de llegar a las células B que secretan anticuerpos de isotipos específicos en altas cantidades, de las que se pueden clonar los correspondientes genes V_H y V_L , las células no necesitan ser inmortalizadas, sino que es suficiente para proporcionarlas sólo la función de activador de células B policlonal temprano del virus de Epstein-Bar (EBV). Como se ilustra en los Ejemplos y se muestra en las figuras 2 a 4, utilizando este enfoque, se indujeron las células B a secretar anticuerpos humanos del isotipo IgG, permitiendo así la detección y clonación de inmunoglobulinas y anticuerpos de interés, respectivamente, que están presentes dentro del cultivo de células B de memoria sólo en cantidades raras o que por las razones mencionadas anteriormente se habrían perdido durante el intento de clonación celular que requiere cultivos a largo plazo y, por tanto, la inmortalización de células B.

25

30

[0012] Por lo tanto, en un aspecto general, la presente invención se refiere a un procedimiento para aislar y producir, respectivamente, un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo con especificidad de antígeno deseada, como se caracteriza en las reivindicaciones, y se ilustra en las figuras 1 y 6, respectivamente, caracterizado por proporcionar cultivos oligoclonales a corto plazo de las células B activadas, preferiblemente células B de memoria que secretan anticuerpos del isotipo IgG, en el que un cultivo de células B aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se somete al activador de células B policlonal de EBV bajo condiciones que son suficientes para estimular/activar la proliferación y secreción de inmunoglobulinas y sin depender de las propiedades de inmortalización del EBV.

35

40

[0013] Además, puesto que en contraste con los procedimientos basados en EBV utilizados en la técnica anterior, los linfocitos B no son inmortalizados, sino que sólo son estimulados/activados con EBV, los anticuerpos se aíslan mediante clonación molecular, es decir, recogida de células individuales de cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés y la clonación de la región variable de los genes de inmunoglobulina de células individuales, en lugar de por clonación celular, es decir producción de líneas celulares a partir de células B inmortalizadas y "clonación" de cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés por dilución limitante tal como se enseña por ejemplo en las solicitudes internacionales WO 2004/076677 y WO 2007/068758.

45

[0014] Como se ilustra en las figuras 1 y 6, se puede realizar un cribado primario con sobrenadantes de cultivo de células B analizados en una sola dilución en el antígeno de interés usando, por ejemplo, el cribado ELISA. Ee puede realizar también el cribado de confirmación con sobrenadante de cultivo de células B analizado a diferentes diluciones en el antígeno de interés y antígenos de interés. Los cultivos reactivos con el antígeno de interés, pero no con otros antígenos son clasificados por células individuales.

50

[0015] El aislamiento de anticuerpos se lleva a cabo mediante clonación molecular. Los genes de inmunoglobulina de células clasificadas de células individuales se secuencian y se clonan en vectores de expresión. Los anticuerpos recombinantes se expresan en células T HEK293 y los sobrenadantes que contienen los anticuerpos recombinantes se ensayan para su unión específica a la diana de interés.

55

Descripción de las figuras

60

[0016]

Figura 1: Representación esquemática de un procedimiento para aislar y expresar anticuerpos monoclonales, incluyendo el procedimiento de la presente invención para la obtención de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas. En primer lugar, se analizan los donantes por la reactividad de células B o suero (incluye antígenos específicos de interés, protoarrays o bibliotecas de expresión). A continuación, se aíslan las células B, se estimulan y se mantienen en cultivos a corto plazo para permitir la proliferación y secreción de anticuerpos en el sobrenadante que se pueden cribar. Los cultivos positivos que producen el anticuerpo con la función y/o actividad de unión deseada son células individuales recogidas. Por último, los anticuerpos se aíslan mediante clonación molecular de genes de inmunoglobulina a partir de células clasificadas por células individuales.

Figura 2: Análisis de muestras de PBMC congeladas procedentes de pacientes con APS1 y control de donante sano. Las PBMC se aislaron de donaciones de sangre fresca de tres pacientes APS1 (APS1-05, APS1-07, APS1-16) y dos donantes sanos (control 1, control 2), y se congelaron en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se analizó la viabilidad mediante el recuento con azul de tripano y el análisis con FSC/SSC por citometría de flujo. La viabilidad de PBMC descongeladas de pacientes con APS1 varió de 47% a 87%, mientras que para las muestras de control estaba siempre por encima de 71% (81% de promedia). FSC/SSC también muestra un porcentaje reducido de células de PBMC descongeladas de los pacientes con APS1 en la puerta de linfocitos.

Figura 3: Producción de Ig de células B de memoria activadas con EBV y CpG de acuerdo con diferentes procedimientos. En primer lugar, se intentó mejorar los protocolos utilizando EBV y CpG mediante la incubación de las células con EBV durante un tiempo limitado y a continuación diluyéndolas mediante la siembra de las células en medio que contiene CpG pero no EBV (dilución), o eliminando EBV a través del lavado de células antes de la siembra en medio que contiene CpG pero no EBV (lavado). Además, se investigó la producción de IgG por células sembradas en diferentes medios (RPMI 1640 o IMDM) en presencia o ausencia de transferrina (Tf), ya que se describió que la transferrina apoya el crecimiento de linfoblastos B inmortalizados con EBV (Gordon, J. Exp. Med. 159 (1984), 1554-1559). Las células B de memoria se clasificaron de muestras de PBMC congeladas de donantes sanos, a modo de ejemplo mostrado para B100413-4 y B121108), se cultivaron a 10 células/pocillo en placas de 96 pocillos de base en U en diferentes medios con diferente % de EBV. Después de 10-11 días, los sobrenadantes de cultivo de dos placas por condición se diluyeron 1:9 y se ensayaron por ELISA para la presencia de IgG humana (hIgG). Se indica el porcentaje de pocillos con niveles de hIgG por encima de la media entre los tres cultivos más elevados y los tres cultivos más bajos (el promedio de resultados de dos placas). Barras:

1. Las células se siembran inmediatamente después de la clasificación en medio RPMI sin Tf suplementado con 20% de sobrenadante de EBV de células B95-8 y 2,5 ug/ml de CpG, con 50.000 alimentadores/pocillo.

2. Las células se incuban durante 4 h 30' con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio IMDM suplementado con Tf y 2,5 ug/ml de CpG y se siembran con 30.000 alimentadores/pocillo.

3. Las células se incuban durante 4 h 30' con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante EBV) y se centrifugan para eliminar el sobrenadante, a continuación se resuspenden y siembran en medio IMDM suplementado con Tf y 2,5 ug/ml de CpG (<0,0002% de sobrenadante EBV) y se siembra con 30.000 alimentadores/pocillo.

4. Como # 3, pero con diferentes alimentadores.

5. Como # 4, pero en medio IMDM sin Tf suplementado con 2,5 ug/ml de CpG.

6. Las células se incuban durante 3 h 30' con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio RPMI sin Tf suplementado con 2,5 ug/ml de CpG y se siembra con 50.000 alimentadores/pocillo.

7. Las células se incuban durante 3 h 30' con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio IMDM sin Tf suplementado con 2,5 ug/ml de CpG y se siembra con 30.000 alimentadores/pocillo.

8. Como # 7, pero en medio IMDM suplementado con Tf y 2,5 ug/ml de CpG.

9. Como # 8, pero con 50.000 alimentadores/pocillo.

Figura 4: Resultados de ejemplo de experimentos dirigidos a la comparación del grado de producción de Ig de células B de memoria preparadas según el procedimiento de inmortalización de células B, tal como se ha descrito en Traggiai et al. Nat. Med. 2004; véase más arriba, y el documento EP 1 597 280 B1, es decir, siembra de células en medio con EBV (20% basado en el ejemplo 8 del documento EP 1 597 280 B1) + CpG (# 1), o 6 horas con 50% EBV antes de la siembra en un medio con EBV + CpG (basado en el Ejemplo 3 de EP 1 597 280 B1) (# 2) y el procedimiento de la presente invención tal como se ilustra en la figura 1, es decir, proporcionar cultivos oligoclonales a corto plazo de células B de memoria activadas por incubación con EBV durante un tiempo limitado (4-6 horas) y a continuación estimuladas con CpG (# 3 a 5). En todos los casos, se utilizaron 30.000 células alimentadoras/pocillo. Después de 11 días, los sobrenadantes de cultivo se ensayan como en la figura 3. Barras:

1. Las células se siembran inmediatamente después de la clasificación en medio RPMI sin Tf suplementado con 20% de sobrenadante de EBV de células B95-8 y 2,5 ug/ml de CpG.

2. Las células se incuban durante 6 horas con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8) y se siembran en medio RPMI sin Tf suplementado con 20% de sobrenadante de EBV de células B95-8 y 2,5 ug/ml de CpG.

3. Las células se incuban durante 6 horas con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio RPMI sin Tf suplementado con 2,5 ug/ml de CpG.

5 # 4. Las células se incuban durante 4 horas con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio IMDM complementado con Tf y 2,5 ug/ml de CpG.

5 Las células se incuban durante 4 horas con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante EBV) y se centrifugan para eliminar el sobrenadante, a continuación se resuspenden y se siembran en medio IMDM suplementado con Tf y 2,5 ug/ml CpG (<0,0002% de sobrenadante EBV).

10 **Figura 5:** Producción de Ig de células B de memoria activadas por EBV de pacientes con APS1. Las células B de memoria se clasificaron a partir de PBMC congeladas de paciente con APS1-07 y se cultivan a 10 células/pocillo en medios con 20% de EBV (tal como se enseña en el documento EP 1 597 280 B1, Ejemplo 8) (# 1), o 30% de EBV (tal como se enseña en Traggi et al; ver supra) (# 2) suplementado con 2,5 ug/ml de CpG, y el procedimiento de la presente invención, tal como se ilustra en la figura 1, es decir, proporcionar cultivos oligoclonales a corto plazo de células B de memoria activadas por incubación con EBV durante un tiempo limitado (3,5 horas) y dilución o lavado de EBV (# 4 y 5, respectivamente) antes de proporcionar el segundo estimulador policlonal CpG. Después de 10 días, los sobrenadantes del cultivo se ensayaron como en la figura 3. Barras:

15 # 1. Las células se siembran inmediatamente después de la clasificación en medio RPMI suplementado con sobrenadante de 20% de EBV de células B95-8 y 2,5 ug/ml de CpG con 50.000 alimentadores/pocillo.

20 # 2. Las células se siembran inmediatamente después de la clasificación en medio RPMI suplementado con 30% de sobrenadante de EBV de células B95-8 y 2,5 ug/ml de CpG con 50.000 alimentadores/pocillo.

25 # 3. Las células se incuban durante 3 horas y 30 minutos con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante de EBV) en medio IMDM suplementado con 2,5 ug/ml de CpG con 30.000 alimentadores/pocillo.

30 # 4. Las células se incuban durante 3 horas y 30 minutos con EBV (50% de sobrenadante de células B95-8), se diluyen 1:230 (0,2% de sobrenadante EBV) y se centrifugan para eliminar el sobrenadante, a continuación se resuspenden y se siembran en medio IMDM suplementado con 2,5 ug/ml de CpG (<0,0002% de sobrenadante EBV) y se siembran con 30.000 alimentadores/pocillo.

35 **Figura 6:** Representación esquemática de un proceso preferido general para identificar células B humanas que secretan anticuerpos IgG que se unen y/o neutralizan antígenos humanos que comprenden los procedimientos de la presente invención para proporcionar cultivos oligoclonales a corto plazo de células secretoras de anticuerpos; tales como las células B de memoria humanas.

Descripción de la invención

40 **[0017]** Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere en general a un procedimiento de producción de un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo con especificidad de antígeno deseada, tal como se caracteriza en las reivindicaciones y se ilustra en las figuras 1 y 6, respectivamente, caracterizado por proporcionar culturas oligoclonales a corto plazo de células B activadas, preferiblemente células B de memoria que secretan anticuerpos del isotipo IgG, en el que un cultivo de células B aisladas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se somete al EBV activador de células B policlonales bajo condiciones que son suficientes para estimular/activar la proliferación y secreción de inmunoglobulinas y sin depender de las propiedades de inmortalización de EBV; y aislar el anticuerpo de interés mediante clonación molecular, es decir, la recogida de células individuales de cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés y la clonación de la región variable de los genes de inmunoglobulina a partir de células individuales.

50 **[0018]** Como se indica en los Ejemplos y se ilustra en las Figuras 1 y 6, las células B de memoria se estimularon primero con un primer activador de células B policlonales, es decir, mediante la incubación con sobrenadante que contiene EBV obtenido de células B95-8 durante un tiempo limitado y a continuación se separa por siembra en un medio diferente con un segunda activador de células B policlonales, es decir, CpG2006.

55 **[0019]** De hecho, durante los experimentos realizados dentro del alcance de la presente invención resultó que los procedimientos anteriores destinados a la inmortalización de células B para proporcionar un clon de células B que produce el anticuerpo de interés, tal como los descritos en la solicitud internacional WO 2004/076677, no funcionan bien, si lo hacen, para las células B de pacientes que sufren de APECED/APS1 que presentan un autoinmunesoma, es decir, un perfil de autoanticuerpos que en su variedad es excepcional y representa un amplio espectro de moléculas de unión específicas para proteínas propensas a invocar una respuesta autoinmune y/o potencialmente asociadas a trastornos relacionados con una respuesta autoinmune no deseada u otras enfermedades autoinmunes. APS1 es una enfermedad autoinmune poco común causada por mutaciones en el gen del regulador autoinmune (AIRE). La proteína AIRE gobierna

la expresión en el epitelio tímico medular de muchos autoantígenos periféricos (por ejemplo, insulina) que son presentados por MHC para tolerar el desarrollo de timocitos. En APS-1, las mutaciones de AIRE causan la selección negativa aberrante, que permite a las células T autorreactivas escapar a la periferia; véase, por ejemplo, Kisand et al., Eur. J. Immunol. 41 (2011), 1517-1527; Peterson et al., Nat. Rev. Immunol. 8 (2008), 948-957 y Kluger, Ranki y Krohn frontal. Immunol. 3 (2012), 232 para su revisión. En este contexto, y en vista de los resultados obtenidos en los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención, la pérdida o un defecto de células T reguladoras en pacientes que sufren de trastornos autoinmunes, en particular observados en los pacientes de APECED (véase, por ejemplo, Laakso et. al., J. Autoimmun 35 (2010), 351-357; Kekäläinen et al, J. Immunol 178 (2007), 1208-1215) pueden ser la causa para el autoinmunesoma mencionado anteriormente.

[0020] Sin pretender estar limitado por la teoría, se cree que debido a la alteración de la tolerancia o la pérdida de la auto-tolerancia del sistema inmunitario, las células B, en particular las que son de interés de acuerdo con la presente invención, han sido preactivadas o desencadenadas a través de una vía de señalización que de otra manera induce o se asocia con la inducción de apoptosis, por cuya razón estas células sólo tienen una vida útil limitada y ya no son efectivamente susceptible de inmortalización tal vez similares a las células B de memoria "agotadas" descritas en la técnica anterior, al menos no en las condiciones descritas hasta ahora para la inmortalización mediada por EBV. En vista de los hallazgos en experimentos realizados de acuerdo con la presente invención, pero sin pretender estar limitado por la teoría, se cree que la aparición simultánea de citoquinas y anticuerpos anti-citoquina, tal como se observa en pacientes con APECED/APS1, dará lugar a la formación de complejos inmunes que podrían unirse a células B y activarlas, lo que explica un estado activado de células B de pacientes con APS1 y su vulnerabilidad a la senescencia. Sin embargo, tal como se ilustra en los Ejemplos y se mencionó anteriormente, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para aislar los anticuerpos humanos mediante el tratamiento y el cultivo de células B de memoria en condiciones de cultivo oligoclonal a corto plazo que permiten solamente una duración de vida definida de las células B durante la activación con la posterior recogida de células individuales o en masa de cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés y la clonación del ADNc de la región variable del anticuerpo.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo con especificidad de antígeno deseada caracterizado por el aislamiento de células B a partir de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas que secretan anticuerpos de isotipo IgG, que comprende las siguientes etapas en la secuencia:

- (a) seleccionar células B de memoria que expresan anticuerpos contra una proteína de interés de una o más muestras biológicas en base a la expresión de al menos un marcador de membrana de la superficie celular y/o de unión a antígeno, en el que dicha muestra biológica deriva de un paciente que sufre de síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS-1)/ poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED), y en el que las células están agotadas de los isotipos IgM e IgD;
- (b) estimular las células seleccionadas con un primer activador de células B policlonal, que es el virus de Epstein-Barr (EBV) en condiciones de cultivo celular durante tres a cinco horas;
- (c) separar las células de dicho activador, en el que el activador se elimina mediante dilución o lavado;
- (d) activar las células estimuladas con un segundo activador de células B policlonal que es un oligonucleótido basado en CpG en condiciones de cultivo celular que no comprenden una citoquina;
- (e) cribar las células activadas que expresan anticuerpos de isotipo IgG de interés y preferiblemente;
- (e') recoger células individuales de los cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés;
- (f) secuenciar y/o clonar el ADNc de al menos las regiones variables de cadena ligera y pesada y opcionalmente la región constante del anticuerpo de interés, en el que el procedimiento no comprende la clonación celular de las células B.

[0021] El término "cultivo oligoclonal" se refiere a un cultivo de células que producen el anticuerpo de interés derivado de una o unas pocas células que han sido activadas. Preferiblemente, el cultivo oligoclonal deriva de una sola célula B, que también se puede denominar como "clon de células B". Como se ha mencionado anteriormente, y a menos que se indique lo contrario, los términos "oligoclonal" y "clon" no implican o se refieren a células inmortalizadas. Tal como se ilustra en los ejemplos, la muestra biológica deriva preferiblemente de células mononucleares de sangre periférica de un paciente cuyo suero ha sido cribado por la presencia de auto-anticuerpos contra la proteína de interés.

[0022] Típicamente, las células B que expresan anticuerpos contra una proteína de interés se seleccionan sobre la base de la expresión de al menos un marcador de membrana de la superficie de células B, tal como preferiblemente CD22. Sin embargo, además o alternativamente, las células B se seleccionan sobre la base de su unión a antígeno usando, por ejemplo, ELISPOT.

[0023] Preferiblemente, las células B son células B de memoria, en particular células B de memoria humanas y están agotadas de isotipos IgM y/o IgD ya antes de la exposición al primer activador policlonal, por ejemplo mediante FACS utilizando anticuerpos específicos de marcador de membrana de la superficie de células B apropiado; véanse también los Ejemplos.

- 5 [0024] Las células productoras de anticuerpos se aíslan, estimulan y proliferan de acuerdo con los procedimientos de la presente invención en cultivos en masa durante un número variable de horas, es decir, de 3 a 5 antes de subdividirse en varios grupos de aproximadamente 10 células por cultivo para la estimulación por el segundo activador policlonal, cada uno representando una población de células, que son cultivadas por separado (por ejemplo, placas de 96, 384 o 1.536 pocillos). La población policlonal en masa de células mantenidas en condiciones de cultivo celular se puede ensayar usando los ensayos ya realizados en sueros para seleccionar el donante, o cualquier otro ensayo relevante para el uso futuro de las células, con el fin de confirmar la presencia de células. Además, algunas partes alícuotas de la población policlonal de células pueden ponerse en viales y se almacenan como células congeladas (como normalmente se hace para líneas celulares de mamífero establecidas), para descongelarse y cultivarse de nuevo más tarde. En este contexto, se pretende que el mismo sobrenadante de cultivo pueda analizarse en varios antígenos diferentes, posiblemente todos los antígenos contra los cuales se han determinado la reactividad de suero de las muestras biológicas, por ejemplo, en un protoarray.
- 10
- 15 [0025] Las alícuotas del sobrenadante del cultivo celular se pueden cribar para su unión y/o actividad funcional de una manera con alto rendimiento, con el fin de identificar el pocillo o pocillos positivos que presentan la actividad deseada, posiblemente usando un análisis de dosis-respuesta con sobrenadantes de cultivo diluidos en serie o preparaciones de anticuerpos parcialmente purificadas (por ejemplo, obtenidas por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A) en experimentos paralelos. Opcionalmente, los grupos positivos de células (es decir, los que muestran la especificidad del antígeno deseado y/o la actividad biológica) puede ser entonces usados para generar una nueva serie de grupos de células para restringir aún más el cribado al nivel de un cultivo o cultivos de células únicas y consecuentemente aislar el ADNc de regiones variables de anticuerpo de la células seleccionada que secreta un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad y la actividad deseadas, por lo menos al nivel del ensayo de cribado inicial. Los anticuerpos monoclonales seleccionados deben entonces reevaluarse utilizando otros ensayos funcionales más exigentes y caracterizarse al nivel de isotipo y de la secuencia de V_H/V_L , después de aislarlos usando tecnologías de ADN recombinante aplicables en las células B.
- 20
- 25
- 30 [0026] Como se ilustra adicionalmente en los ejemplos, el primer activador de células B policlonal es el virus de Epstein-Barr (EBV) y el segundo activador de células B policlonal es un oligonucleótido basado en CpG, en particular CpG2006 (ODN 2006 según Hartmann et al., J. Immunol. 164 (2000), 1617-1624).
- 35 [0027] En este contexto, se hace constar que aunque el EBV se ha utilizado en la técnica anterior para inmortalizar células B, EBV y agentes de inmortalización virales similares tienen actividades duales, es decir, además de la capacidad de inmortalizar células B en condiciones de cultivo de células apropiadas para también activar independientemente las células B, inducen la proliferación y la secreción de Ig. Esta función temprana de EBV es distinta de su función tardía de líneas de células B de inmortalización, tal como se muestra por Tsuchiyama et al., Hum. Antibodies 8 (1997), 43-47. Por consiguiente, la presente invención solamente utiliza la función temprana como un activador de células B policlonales de EBV y de agentes de inmortalización virales similares, pero no de la función tardía como un virus transformante capaz de generar líneas de células B inmortalizadas que pueden mantenerse en cultivo celular durante varios meses, con lo que solamente proporcionan y usan cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas con duración de vida limitada, tal como se describe más adelante. La utilización sólo la función temprana de EBV y agentes similares puede llevarse a cabo mediante el ajuste del tiempo de cultivo de las células en presencia de EBV sólo en la medida necesaria para conseguir una estimulación de las células, es decir, la proliferación de las células y la secreción de anticuerpos, con la posterior separación de las células de EBV y agentes similares o viceversa.
- 40
- 45 [0028] Como resultó adicionalmente en los experimentos llevados a cabo dentro del alcance de la presente invención e ilustrados en los Ejemplos, la presencia de una citoquina, tal como interleuquina-2 (IL-2), como se enseña en las patentes europeas EP 1 974 020 B1 y EP 1 597 280 B1 u otras moléculas coestimuladoras, tales como transferrina, no es necesaria. Más bien, resultó que en el procedimiento de la presente invención la presencia de citoquinas en el cultivo de células B no tiene sustancialmente efectos beneficiosos, probablemente debido a la preactivación o señalización mencionada en las células B. Por consiguiente, en una realización preferida del procedimiento de la presente invención, las condiciones de cultivo en la etapa (d) y opcionalmente en la etapa (b) no comprenden una citoquina.
- 50
- 55 [0029] La estimulación de las células seleccionadas con el primer activador de células B policlonal dura menos de 6 horas, en particular, las células seleccionadas en la etapa (b) se estimulan durante aproximadamente tres a cinco horas.
- 60 [0030] Después de la activación, las células B se separan del primer activador de células B policlonal en la etapa (c), en la que el activador se elimina mediante dilución o lavado. En este contexto, los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención confirmaron que la presencia del primer activador de células B policlonal es de hecho no necesaria al asegurar la eliminación total de cualquiera de los mismos utilizando múltiples etapas de lavado antes de someter las células estimuladas al segundo activador de células B policlonal. Sin embargo, para los fines del procedimiento de la

presente invención por lo general es eficaz eliminar el primer activador de células B policlonal mediante dilución, es decir, la siembra de las células B en medio de cultivo fresco. Por lo tanto, el cultivo celular sometido al primer activador de células B policlonal se puede colocar en medio de cultivo fresco que contiene el segundo activador policlonal diluyendo así el medio con el primer activador policlonal a un máximo de aproximadamente 10%, preferiblemente 5%, más preferiblemente 1 %, y lo más preferiblemente sustancialmente por debajo de 1%, por ejemplo 0,5%, 0,1% o menos.

[0031] Típicamente, durante el cultivo en presencia del segundo activador policlonal, las células B se siembran a baja concentración de células por cultivo, por ejemplo en pocillos de placa de cultivo de microtitulación. Preferiblemente, la concentración de células por pocillo es de 5 a 20, más preferiblemente 5 a 15 y lo más preferiblemente 10.

[0032] Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria y se ilustran en los Ejemplos, en la etapa (d) las células B estimuladas se cultivan en presencia del segundo activador de células B policlonal CpG no más de una a dos semanas hasta seleccionar las células de los cultivos de células B que son reactivas contra el antígeno deseado. En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, las células seleccionadas transferidas están expuestas en la etapa (d) al segundo activador policlonal durante aproximadamente ocho a catorce días. Preferiblemente, en la etapa (d) y/o (e) las células se cultivan bajo condiciones oligoclonales con aproximadamente diez células por pocillo en cultivos a corto plazo de ocho a catorce días.

[0033] Los procedimientos de la invención pueden aplicarse para la identificación de anticuerpos monoclonales expresados por células B humanas seleccionadas de cualquier donante adecuado, es decir, puede ser sin tratar, vacunado, afectado por una o más enfermedades o infecciones, ya expuesto y/o resistente a tratamientos terapéuticos específicos, que presentan un índice o estado clínico específico, expuesto inadvertidamente a un patógeno, etc. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención parece ser particularmente ventajoso para el aislamiento de anticuerpos humanos de sujetos que sufren de un trastorno autoinmune o enfermedad inflamatoria y enfermedades similares, especialmente cuando va acompañada de una viabilidad y/o capacidad de respuesta reducidas de las células B de memoria.

[0034] Se pueden utilizar sueros de donantes como tales para una determinación inicial de su seropositividad a un antígeno, ya que la especificidad y mantenimiento a largo plazo de las respuestas inmunitarias adaptativas (incluso años después de la última exposición a este antígeno) pueden permitir una determinación cualitativa que es suficiente para la selección de donantes. La naturaleza y la sensibilidad del ensayo de cribado utilizado son críticos en la identificación del donante más adecuado y, preferiblemente, el ensayo utilizado para cribar el suero del donante debe ser el mismo que el utilizado para cribar los sobrenadantes de cultivos oligoclonales de células B secretoras de anticuerpos y debe estar diseñado para detectar un anticuerpo con la actividad funcional deseada (es decir, neutralización y/o unión al antígeno de interés)

[0035] En el contexto clínico, la elección del tejido o el órgano del que las células se purifican pueden ser dictados por la disponibilidad de las células en cantidad suficiente para llevar a cabo todo el proceso. Dado que las células se pueden obtener a partir de muestras clínicas humanas en pequeñas cantidades y/o se preparan en lugares diferentes de donde se pueden realizar los procedimientos de la presente invención, las células pueden obtenerse a partir de muestras congeladas y/o a partir de muestras obtenidas de un número de individuos que han sido agrupadas para proporcionar material de partida suficiente.

[0036] De este modo, se puede realizar un cribado preliminar en un panel de donantes candidatos, utilizando muestras que contienen células secretoras de anticuerpos (tales como sangre periférica total o suero). En particular, las células mononucleares se pueden aislar de sangre u otros tejidos linfáticos usando técnicas estándar de separación para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tales como centrifugación por gradiente. Después de y/o antes de esta etapa de separación, las muestras de suero (o plasma), los sobrenadantes de cultivo de células, o las células (obtenidas de diferentes pacientes, de diferentes tejidos, y/o en diferentes puntos de tiempo) pueden preseleccionarse usando tecnologías estándar para detectar la presencia de anticuerpos y células secretoras de anticuerpos (por ejemplo ELISA, BIACORE, transferencia Western, FACS, SERPA, arrays de antígenos, neutralización de infección viral en un sistema de cultivo de células, o ensayos ELISPOT). La bibliografía proporciona varios ejemplos de estas tecnologías que muestran, por ejemplo, el uso de ELISPOT para la caracterización de la respuesta inmunitaria en donantes vacunados (Crotty et al., Immunol Meth. 286 (2004), 111-122), el uso de microarrays de antígenos como herramientas de diagnóstico para pacientes recientemente infectados (Mezzasoma et al., Clin Chem. 48 (2002), 121-130, y otras tecnologías para medir la respuesta inmune específica de antígeno (Kern et al., Trends Immunol. 26 (2005), 477-484) .

[0037] Como se mencionó, se emplea el procedimiento de la presente invención utilizando una muestra biológica derivada de un sujeto que padece un trastorno autoinmune y/o enfermedad inflamatoria, en particular, síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS-1)/poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED).

[0038] Como se ilustra en las figuras 1 y 6, el ADNc se preparará a partir de células B individuales clasificadas de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas que secretan el anticuerpo de interés con el fin de aislar y producir el anticuerpo monoclonal de la presente invención. Por consiguiente, el procedimiento de la presente invención comprende típicamente las etapas de:

- 5 (i) obtener ARNm de células B en masa o individuales clasificadas de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas que secretan el anticuerpo de la invención;
- (ii) obtener ADNc a partir del ARNm de la etapa (i);
- (iii) usar una reacción de extensión del cebador para amplificar a partir de dicho ADNc el repertorio de genes que corresponden a las cadenas pesadas (HC) y a las cadenas ligeras (LC) y opcionalmente los dominios constantes de dichos anticuerpos;
- 10 (iv) usar dicho repertorio para expresar dicho anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula huésped;
- (v) identificar el clon de anticuerpo presumiblemente responsable de la reactividad del cultivo de células B parentales; y
- (vi) aislar el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- 15 opcionalmente en el que el ADN se manipula entre las etapas (iii) y (iv) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones, introducir secuencias codificantes para dominios funcionales o enlazadores peptídicos; y/o para añadir o para optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción. El RT-PCR de células clasificadas individuales se emplea preferentemente para la obtención del repertorio de genes de inmunoglobulina para dicho anticuerpo. Un procedimiento de obtención de anticuerpos humanos utilizando, entre otras cosas, RT-PCR de células
- 20 individuales se describe por ejemplo en la solicitud internacional WO2008/110372, en particular la sección de Procedimientos complementarios y en el Ejemplo 2. Como se usa en este documento, los términos "ADNc" y "ARNm" abarcan todas las formas de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN genómico, ADNc y ARNm. La clonación y expresión heteróloga del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se pueden realizar usando técnicas convencionales de biología molecular y ADN recombinante, que están dentro de la capacidad de la técnica (Wrammert et al., Nature 453 (2008), 667-671 y Meijer et al., 2006 J. Mol. Bio. 358 (2006), 764-772). Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo en Sambrook, 1989 Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición. Para la recuperación y la expresión de las secuencias de VH/VL se pueden utilizar el procedimiento de Tiller et al., en J. Immunol. Methods 329 (2008), 112-124. Se puede utilizar cualquier célula huésped apropiada para la expresión del anticuerpo humano recombinante, por ejemplo, una levadura, una célula vegetal o una célula animal. Preferiblemente, se usan células huésped de mamífero, tales células CHO y células HEK; véase también, por ejemplo, la patente europea EP 1 974 020 B1 en las secciones [0164] a [0171].

[0039] En una realización, la región constante del anticuerpo de la presente invención o parte de la misma, en particular el dominio CH2 y/o CH3, pero opcionalmente también el dominio CH1, es heteróloga a la región variable del anticuerpo monoclonal humano nativo aislado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. En este contexto, la región o regiones constantes heterólogas son preferiblemente de origen humano en el caso de aplicaciones terapéuticas del anticuerpo de la presente invención, pero también podría ser de, por ejemplo, origen roedor en caso de estudios con animales.

[0040] En una realización del procedimiento de la presente invención, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en proteínas extracelulares y proteínas, polisacáridos, lipopoliproteínas y lipopolisacáridos, que son secretados, están asociados o unidos a una membrana o transmembrana. Sin embargo, en principio, el procedimiento de la presente invención es capaz de proporcionar autoanticuerpos contra cualquier antígeno deseado. Esto se debe a que los sujetos usados de acuerdo con la invención, es decir, aquellos que sufren de un trastorno autoinmune y cuya tolerancia central y/o periférica alterada o la pérdida de la autotolerancia son causadas por un genotipo particular, es decir, un trastorno autoinmune monogénica debido a la capacidad de respuesta general de su respuesta inmune humoral por un lado y su exposición a diferentes estímulos y condiciones internas y externas, respectivamente, que comprenden la predisposición a un trastorno hereditario, toxinas, infecciones, trastornos relacionados con la edad y similares, por otro lado, proporcionan un conjunto de autoanticuerpos que van desde autoanticuerpos comunes a la mayoría, si no todos, los sujetos a autoanticuerpos que son específicos para una enfermedad o afección individual. Para los autoanticuerpos que se encuentran comúnmente en el conjunto de muestras en una realización del procedimiento de la presente invención el antígeno se selecciona del grupo que consiste en leucotrienos, linfoquinas, citocinas, interleuquinas, interferones y quimioquinas.

[0041] Por lo tanto, se ha demostrado la idoneidad del procedimiento de la presente invención para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos específicos para y capaces de neutralizar la interleuquina-17A (IL-17A), la interleuquina-17F (IL-17F) o interleuquina-22 (IL-22) de células B de memoria obtenidas de pacientes con el síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS-1) y se describe en la solicitud internacional en trámite del solicitante WO2013/098419.

60

[0042] Los anticuerpos aislados de la presente invención pueden, por supuesto, no aplicarse como tal a un paciente, pero por lo general tienen que formularse farmacéuticamente para asegurar, por ejemplo, su estabilidad, aceptabilidad y biodisponibilidad en el paciente. Por lo tanto, en una realización, el procedimiento de la presente invención comprende además la etapa de mezclar el anticuerpo monoclonal aislado con un portador farmacéuticamente aceptable. Una discusión minuciosa de portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en *Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, NJ 1991) de Remington y en Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, ISBN: 0683306472. Las formas preferidas para administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o perfusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o perfusión continua. Cuando el producto es para inyección o perfusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes utilizados comúnmente en formulaciones farmacéuticas, tales como agentes de suspensión, conservante, estabilizantes y/o agentes dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para la reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado. Una vez formuladas, las composiciones pueden administrarse directamente al sujeto. Se prefiere que las composiciones estén adaptadas para la administración a sujetos humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier número de vías incluyendo, pero no limitado a, vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal.

[0043] Los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos se pueden usar directamente como un agente terapéutico. Sin embargo, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se proporciona por la presente invención, está marcado detectablemente o unido a un fármaco, por ejemplo en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado. Los anticuerpos marcados o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden usarse para detectar dianas específicas in vivo o in vitro, incluyendo ensayos de tipo "inmunoquímica/inmunomarcaje" in vitro. In vivo se pueden usar de una manera similar a las técnicas de formación de imágenes de medicina nuclear para detectar tejidos, células, u otro material que expresan el antígeno de interés. Los marcadores, su uso en el diagnóstico y su acoplamiento a las moléculas de unión de la presente invención son conocidos por la persona experta en la técnica.

[0044] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un anticuerpo o porción de unión del mismo de unión a antígeno para uso farmacéutico o como diana para la intervención terapéutica, que comprende las etapas de cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos de la presente invención y se ilustra en las figuras 1 y 6, opcionalmente en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo está marcado de forma detectable o unido a un dominio funcional o fármaco, preferiblemente en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

[0045] La descripción anterior describe generalmente la presente invención. A menos que se indique lo contrario, un término tal como se utiliza en la presente invención proporciona la definición tal como se proporciona en el *Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular*, Oxford University Press, 1997, revisada en 2000 y reimpresa en 2003, ISBN 0 19 850 673 2. Se citan varios documentos en el texto de esta memoria.

EJEMPLOS

[0046] Los ejemplos siguientes y las figuras correspondientes ilustran adicionalmente la invención. Las descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en el presente documento, se pueden encontrar en la literatura citada.

[0047] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Los procedimientos de genética molecular e ingeniería genética se describen generalmente en las ediciones actuales de *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Sambrook et al, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames y Higgins eds 1984.); *Transcription and Translation* (Hames y Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller y Calos, eds.); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición (Ausubel et al, eds); y *Recombinant DNA Methodology* (Wu, ed., Academic Press). *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller y Calos, eds, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory.); *Methods in Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu et al, eds.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., Nueva York); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds, Academic Press, Londres, 1987.); *Handbook of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, vectores de clonación, y kits para manipulación genética a los que se hace referencia en esta descripción están disponibles de

proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y Clontech. Las técnicas generales de cultivo celular y los tipos de medios se describen en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al, Curr Opin Biotechnol 8 (1997), 148); Serum-Free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr Opin Biotechnol 2 (1991), 375); and Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251.

5

Material y procedimientos

Cultivo a corto plazo de células B de memoria estimuladas policlionalmente

10 [0048] Las células B de memoria se aislaron de células mononucleares de sangre periférica humanas derivadas de la
 sangre periférica de pacientes finlandeses voluntarios con poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia
 ectodérmica (APECED, OMIM 240300), también llamada síndrome poliendocrino autoinmune de tipo 1 (APS1) y
 voluntarios sanos con un protocolo de una etapa usando mAb anti-IgD humana conjugado a ficoeritrina, mAb anti-IgM
 humana conjugados a APC, CD3, CD56, CD8 y mAb anti-CD22 humano conjugado a FITC (Becton Dickinson, Basilea,
 15 Suiza). La clasificación de células se llevó a cabo usando un clasificador de células MoFlo XDP (Beckman Coulter). Las
 células B positivas de CD22 y negativas de CD3, CD56, CD8, IgM e IgD fueron entonces policlionalmente estimuladas con
 las funciones tempranas de EBV (Tsuchiyama et al., Hum Antibodies. 8 (1997), 43-47) mediante su incubación con el
 sobrenadante obtenido a partir de células B95-8 ((máximo hasta el 50% de sobrenadante B95-8 en un volumen total de 2
 ml de RPMI 1640 con GlutaMAX®-I complementado con piruvato de sodio al 1%, 1% de aminoácidos no esenciales, 50
 20 U/ml de penicilina/estreptomycin, 50 uM de b-mercaptoetanol, suero bovino fetal al 10%). Después de 3 a 5 horas
 (preferiblemente 3 horas 30 minutos) de incubación, el EBV se diluye mediante la dilución de las células B de memoria en
 un volumen apropiado de medio IMDM con L-glutamina, suplementado con piruvato de sodio al 1%, 1% de aminoácidos
 no esenciales, 50 U/ml de penicilina/estreptomycin, 50 uM de b-mercaptoetanol, suero bovino fetal al 10% y CpG 2006
 (2,5 ug / ml) (en algunos experimentos se han suplementado también 30 ug/ml de transferrina (Life Technologies)) y se
 25 irradian PBMC alimentadoras preparadas de donantes sanos para sembrar 10 células B de memoria y 30.000 células
 alimentadoras de PBMC por pocillo de placas de 96 pocillos de base en U en 200 ul. La dilución de sobrenadante de EBV
 es típicamente > 1:800 (es decir, 0,125%). Alternativamente, el EBV se lava mediante centrifugación de las células y
 descarte de los sobrenadantes. En algunos casos, las células se sembraron con 50.000 células alimentadoras de PBMC
 por pocillo.

30

[0049] Las condiciones de cultivo que apoyan la secreción de IgG humana se evaluaron en el día 9-12 mediante la
 determinación del porcentaje de cultivos con niveles de IgG humana en sobrenadantes diluidos 1:9 que están por encima
 de la media entre los tres cultivos más altos y los tres más bajos. Para cada condición de cultivo probada, los
 sobrenadantes de dos placas se midieron por ELISA.

35

[0050] Después de 8-14 días de cultivo, se cribó el medio acondicionado de cultivo de células B de memoria para la
 presencia de un antígeno de anticuerpos específicos de interés (por ejemplo, IL-17, IL-22) mediante ELISA. En este
 contexto, el mismo sobrenadante de cultivo puede analizarse en varios antígenos diferentes (posiblemente todos los
 antígenos contra los que se observó reactividad del suero para la muestra biológica, por ejemplo, en protoarray. Por
 ejemplo, microplacas de 96 pocillos (Costar, EE.UU.) se recubren con el antígeno de interés. Las placas se lavan con
 PBS-T y se bloquean 1 h a temperatura ambiente con PBS que contenía 2% de BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Los sueros
 40 de pacientes, medio acondicionado de células B, o preparaciones de anticuerpos recombinantes se incuban durante 2
 horas a temperatura ambiente. La unión de IgG humana para el antígeno de interés se puede determinar usando un
 anticuerpo específico de Fc-gamma de IgG anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson
 ImmunoResearch, Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido), seguido de medición de la actividad HRP utilizando una
 45 solución de sustrato TMB (TMB, Sigma, Buchs, Suiza).

Ejemplo 1: Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con APECED/APS-1

50 [0051] Como material de partida para la clonación con aislamiento de anticuerpos completamente humanos, se utilizaron
 linfocitos humanos obtenidos de la sangre periférica de 23 pacientes finlandeses voluntarios con poliendocrinopatía
 autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED, OMIM 240300), también llamado Síndrome poliendocrino
 autoinmune de tipo 1 (APS1). Estos voluntarios fueron reclutados para la donación de sangre a través de la asociación de
 pacientes finlandesa de APECED y Addison. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y el
 estudio ha sido aprobado por el Comité de Revisión Ética de Medicina de la Autoridad Conjunta del distrito hospitalario de
 Helsinki y Uusimaa. APECED es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen de AIRE (regulador
 autoinmune), localizado en el cromosoma 21 (21q22.3) y APECED es prevalente en Finlandia (1/25.000) a causa de un
 efecto fundador. Los pacientes con APECED presentan diversas disfunciones autoinmunes endocrinas incluyendo
 principalmente insuficiencia adrenal e hipoparatiroidismo, pero también diversamente hipogonadismo, diabetes mellitus,
 60 tiroiditis y hipofisitis. Otros síntomas principales son candidiasis mucocutánea crónica, alopecia y vitíligo (véase también
 supra). Dado que se ha descrito una fuerte correlación entre los niveles de IgG específicos de antígeno en el suero y la

frecuencia de células B específicas de antígeno en la agrupación de memoria de células mononucleares de sangre periférica (Bernasconi et al. 2002, Lanzavecchia et al. 2006), los sueros de los pacientes se cribaron primero por la presencia de autoanticuerpos contra las proteínas de interés (como IFN, IL-17, IL-22) y, a continuación se seleccionaron aquellos casos de APECED con título elevado (> 1:5000) para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la siguiente manera. Se obtuvo sangre periférica heparinizada y se diluyó con dos volúmenes de 1x PBS a temperatura ambiente, y las células se cubrieron en Lympholyte H, se centrifugaron a 2000 rpm (805 RCF) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células se recogieron en la interfase, se mezclaron en el relleno de tampón de lavado, se centrifugaron a 1.500 rpm (453 rcf) durante 15 min a 4°C y se resuspendieron con un movimiento rápido suave, con 10 ml de WB. A continuación, las células se centrifugaron a 1.000 rpm (201 rcf), 10 min a 4°C y se lavaron una vez más con WB. Las células se resuspendieron a continuación suavemente en volumen apropiado de FBS en hielo. Se añadió FBS para ajustar el volumen para tener 20 mio/ml, después de lo cual se añadió lentamente 1 volumen de medio de congelación (80% de FBS (Hyclone, Thermo Scientific y 20% de DMSO, # 154938, Sigma), mientras se agitaba, se resuspendió y se dividió en alícuotas en crioviales mantenidos en hielo. Los crioviales se colocaron en una caja de Mr. Frosty y se transfirieron a un congelador a -80°C durante un máximo de 5 días antes de la congelación en nitrógeno líquido o procesamiento posterior, tal como se describe en los Ejemplos 2-4. Alternativamente, los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2: Viabilidad reducida de PBMC descongeladas y porcentaje reducido de células de PBMC descongeladas de pacientes con APS1 en la puerta de linfocitos

[0052] Alícuotas de 1 ml de PBMC congeladas preparadas como en el Ejemplo 1, se descongelaron en un baño de agua a 37°C, se colocaron sobre 10 ml de medio completo RPMI 1640 enfriado en hielo y se mezclaron suavemente. Se tomó una alícuota de las células para el recuento de células con azul de tripano, mientras las células restantes se centrifugaban. El sobrenadante se descartó y las células se procesaron tal como se indica en el material y los procedimientos para el aislamiento de células B de memoria. La figura 2 muestra gráficos de puntos de FCS/SSC de PBMC de pacientes con APS1 y controles de donantes sanos teñidas para la clasificación de células B de memoria (clasificador MoFlow). La viabilidad de PBMC descongeladas de pacientes con APS1 varió de 47% a 87%, mientras que para las muestras de control estaba siempre por encima de 71% (81% de promedio). FSC/SSC también muestra un porcentaje reducido de células de PBMC descongeladas de los pacientes con APS1 en la puerta de linfocitos. Estos datos indican que las células de pacientes con APS1 son frágiles y particularmente sensibles a la congelación y descongelación.

Ejemplo 3: Producción de Ig por los cultivos a corto plazo de células B de memoria activadas con CpG después de la eliminación de EBV

[0053] Los intentos previos de clonación celular de células B de memoria humanas transformadas con EBV específicas de antígeno tumoral identificado no habían tenido éxito (WO 2008/110373 A1). Del mismo modo, durante los experimentos realizados dentro del alcance de la presente invención resultó que los procedimientos anteriores dirigidos a la inmortalización de células B para proporcionar un clon de células B que produce el anticuerpo de interés, tales como los descritos en la solicitud internacional WO 2004/076677 no funcionan bien, si lo hacen, para las células B de pacientes con APS1, lo que sugiere que la mayoría de las células no se transforma y no se inmortalizan. Por lo tanto, se decidió intentar el aislamiento de anticuerpos de especificidad de antígeno deseada mediante la clonación de genes de inmunoglobulina a partir de células individuales clasificadas de cultivos oligoclonales a corto plazo (1-2 semanas) en lugar de mediante clonación celular de células B inmortalizadas. Con el objetivo de inducir la secreción de anticuerpos en cantidades detectables para permitir ensayos de cribado apropiados para la selección temprana (en 2 semanas) de cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés, se hicieron intentos para mejorar las condiciones de cultivo de células B. Además, se encontró que la transferrina era el único factor exógeno esencial para apoyar el crecimiento de linfoblastos B inmortalizados con EBV (Gordon, J Exp Med 159 (1984): 1554-1559). Basado en esto, se trató de mejorar los protocolos utilizando EBV y CpG mediante la incubación de las células con EBV durante un tiempo limitado y a continuación diluyéndolas mediante el sembrado de las células en medio que contiene CpG pero no EBV (dilución) o la eliminación de EBV a través de lavado de células antes del sembrado en un medio que contiene CpG pero no EBV (lavado). Además, se investigó la producción de IgG por células sembradas en diferentes medios (RPMI 1640 o IMDM) en presencia o ausencia de transferrina. Los procedimientos y condiciones de cultivo específicas se detallan en material y procedimientos y en la leyenda de las figuras 3, 4 y 5. Los experimentos se realizaron con células de control de donantes sanos (Figuras 3 y 4) y con células de un paciente con APS1 (Figura 5).

[0054] Tal como se muestra en la Figura 3, la incubación limitada de células con EBV antes de la siembra en un medio sin EBV suplementado con CpG dio mejores resultados que la exposición de las células al mismo tiempo a EBV y CpG. De hecho, se observó un porcentaje casi dos veces mayor de cultivos productores de IgG cuando EBV se diluyó o se lavó después de 4 horas y 30 minutos y las células se sembraron en medio IMDM complementado con transferrina y CpG (# 2 y 3) en comparación con células sembradas en placas directamente en medio RPMI suplementado con EBV y CpG. Además, se obtuvieron resultados similares si EBV se diluía o se eliminaba completamente mediante centrifugación

de las células y descarte de los sobrenadantes (comparar # 2 y 3). Además, los cultivos sembrados en medio IMDM rindieron mejor que los cultivos sembrados en medio RPMI (comparar # 6 y 7) y en lugar de ser beneficioso (como sería de esperar si las células B fueran transformadas por EBV en esta etapa), la transferrina demostró ser perjudicial (comparar # 4 y 5, y # 7 y 8).

[0055] Los resultados anteriores se confirmaron en los experimentos mostrados en la figura 4, destinada a la comparación directa del procedimiento de la presente invención (# 3-5) con el procedimiento descrito para inmortalizar células, tal como se describe en Traggiai et al. Nat. Med. 2004 y el documento EP 1 597 280 B1, es decir, sembrar células en un medio con EBV (20% basado en el ejemplo 8 del documento EP 1 597 280 B1) + CpG (# 1), o 6h con 50% EBV antes de sembrar en un medio con EBV + CpG (basado en el Ejemplo 3 de EP 1 597 280 B1) (# 2). Una vez más, casi la mitad de los cultivos productores de IgG se obtuvieron cuando las células se sembraron en medio con 20% EBV y CpG en comparación con los cultivos expuestos sólo temporalmente a EBV y después se estimularon con CpG en ausencia de EBV (comparar # 1-2 con 3-5). También en este caso, en todo caso, eliminar por completo el EBV (lavado) era mejor que la dilución (dilución) (# 5 y 4).

[0056] En el experimento mostrado en la Figura 5, las células de pacientes con APS1-07 se utilizaron para comparar adicionalmente el grado de secreción de IgG por las células tratadas de acuerdo con el procedimiento de inmortalización de EBV, tal como se enseña en el documento EP 1 597 280 B1, Ejemplo 8) (# 1), o como se enseña en Traggiai et al) (# 2), mediante el sembrado de células en medio suplementado con 2,5 ug/ml de CpG y 20% o 30% de EBV respectivamente, y mediante cultivos oligoclonales generados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, es decir la incubación con EBV durante un tiempo limitado (3,5 horas) y diluyendo o lavado EBV (# 4 y 5, respectivamente) antes de proporcionar el segundo estimulador policlonal CpG. También en este caso una exposición limitada a EBV condujo a un mayor porcentaje de cultivos productores de IgG (# 3-4 y 1-2).

Ejemplo 4: Aislamiento de anticuerpos humanos de especificidad deseada mediante clonación molecular

[0057] Se aislaron células B de memoria PBMC derivadas de la sangre periférica de pacientes voluntarios finlandeses con APECD y se estimularon policlonalmente con EBV y a continuación se activaron con CpG en cultivos a corto plazo para permitir la secreción de anticuerpos, tal como se ilustra en la figura 6 y se describe en material y procedimientos y en el ejemplo 3. Después de 7 a 14 días, los sobrenadantes del cultivo son cribados para detectar la presencia de anticuerpos específicos para la diana de interés (por ejemplo, IL17, IL-22), por ejemplo utilizando un ensayo ELISA estándar. Usando un clasificador de células, se depositan células individuales de cultivos a corto plazo de células B de memoria oligoclonales reactivos de IL-17/IL-22 (una o dos semanas) en una placa de PCR de 96 pocillos, que contiene un primer tampón de cadena (Invitrogen, LuBioScience, Suiza). El ADNc se prepara utilizando un cebador de hexámero Random (Invitrogen, LuBioScience, Suiza). La amplificación por PCR de las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se lleva a cabo de acuerdo con protocolos estándar (Wardemann et al., Science 301, 2003, 1374-1377). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son amplificadas utilizando una estrategia de PCR anidada. Se realiza una primera ronda de PCR con cebadores específicos para la región constante de IgG y mezclas de cebadores específicos para todos los péptidos señal de las familias de la región variable de Ig de cadenas pesada y ligera (Wardemann et al., Science 301, 2003, 1374-1377). Posteriormente, la PCR anidada se realiza usando mezclas de cebadores específicos para las regiones J de inmunoglobulina y la región 5' del marco 1 de las familias de la región variable de Ig de cadenas pesada y ligera. El análisis de secuencia se lleva a cabo para identificar los clones de anticuerpos individuales presentes en el cultivo de células B seleccionado. Posteriormente, las regiones pesada y ligera variables de Ig de cada clon de anticuerpo se clonan en vectores de expresión que proporcionan las regiones constantes de IgG humana, Ig-Kappa humana o Ig-Lambda humana. Tras la cotransfección de los vectores de expresión pesada y ligera de Ig en células HEK 293, se producen los clones de anticuerpos. La identificación del clon de anticuerpo presumiblemente responsable de la reactividad de IL-17/IL-22 del cultivo de células B parentales se realiza tras el recribado de los clones de anticuerpos recombinantes en ELISA de IL-17/IL-22 y control.

[0058] Con el fin de identificar y corregir los desajustes de secuencia codificada por cebador en la región variable de Ig, se lleva a cabo una amplificación por PCR adicional usando un protocolo semi-anidado con 2 pares de cebadores específicos para una región conservada de las regiones constantes de cadena pesada y ligera de Ig como cebadores 3' y mezclas de cebadores específicos para los péptidos señal de Ig como cebadores 5'. Los productos de PCR se clonan en vector TOPO® (Invitrogen, LuBioScience, Lucerna, Suiza). Se lleva a cabo la determinación de la secuencia de la región variable de Ig completa y la información se utiliza para diseñar cebadores específicos para la clonación de la secuencia del anticuerpo humano auténtico en vectores de expresión de anticuerpos. Este enfoque permite la identificación de la secuencia del anticuerpo completa de la región variable de Ig tal como se produjo en el paciente. Esta secuencia se utiliza para la producción recombinante de estos anticuerpos que se utilizan a continuación en las etapas de caracterización posteriores.

Ejemplo 5: Producción y purificación de anticuerpos

5 **[0059]** La expresión génica transitoria de anticuerpos humanos se logra después de la transfección de vectores de expresión de anticuerpos en células de riñón embrionario humano 293-T o células de ovario de hámster chino (CHO) usando el procedimiento de transfección de polietilenimina (PEI, Polyscience Warrington, EE.UU.). Después de la transfección, las células se cultivan en medio libre de suero (OPTI-MEM I suplementado con GlutaMAX-I Gibco). Los sobrenadantes se recogen después de 3-6 días de cultivo y las IgG se purifican usando columnas de proteína A (GE Healthcare, Suecia) en un dispositivo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (GE Healthcare, Suecia).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo con especificidad deseada **caracterizado por** el aislamiento de células B de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas que secretan anticuerpos de isotipo IgG que comprende las siguientes etapas en la secuencia:
- 5 (a) seleccionar células B de memoria que expresan anticuerpos contra una proteína de interés de una o más muestras biológicas en base a la expresión de al menos un marcador de membrana de la superficie celular y/o de unión a antígeno, en el que dicha muestra biológica deriva de un paciente que sufre de síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS-1)/poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED), y en el que las células están
- 10 agotadas de los isotipos IgM e IgD;
- (b) estimular las células seleccionadas con un primer activador de células B policlonal que es el virus de Epstein-Barr (EBV) en condiciones de cultivo celular durante tres a cinco horas;
- (c) separar las células de dicho activador, en el que el activador se elimina mediante dilución o lavado;
- 15 (d) activar las células estimuladas con un segundo activador de células B policlonal que es un oligonucleótido basado en CpG en condiciones de cultivo celular que no comprenden una citoquina;
- (e) cribar las células activadas que expresan anticuerpos de isotipo IgG de interés y preferiblemente;
- (e') recoger células individuales de los cultivos oligoclonales que producen el anticuerpo de interés;
- (f) secuenciar y/o clonar el ADNc de al menos las regiones variables de cadena ligera y pesada y opcionalmente la región constante del anticuerpo de interés,
- 20 en el que el procedimiento no comprende la clonación celular de las células B.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el marcador de superficie celular es CD22.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, en el que las condiciones de cultivo en la etapa (b) no comprenden una citoquina.
- 25 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa (d) las nuevas células seleccionadas mencionadas transferidas se exponen al segundo activador policlonal durante de ocho a catorce días.
- 30 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa (d) y/o (e) las células se cultivan bajo condiciones oligoclonales con diez células por pocillo en cultivos a corto plazo de ocho a catorce días.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (f) comprende
- 35 (i) obtener ARNm de células B en masa o individuales clasificadas de cultivos oligoclonales a corto plazo de células B activadas que secretan el anticuerpo de la invención;
- (ii) obtener ADNc a partir del ARNm de la etapa (i);
- (iii) usar una reacción de extensión del cebador para amplificar a partir de dicho ADNc el repertorio de genes que corresponden a las cadenas pesadas (HC) y a las cadenas ligeras (LC) y opcionalmente los dominios constantes de dichos anticuerpos;
- 40 (iv) usar dicho repertorio para expresar dicho anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula huésped;
- (v) identificar el clon de anticuerpo presumiblemente responsable de la reactividad del cultivo de células B parentales; y
- (vi) aislar el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo; opcionalmente en el que el ADN se manipula entre las etapas (iii) y (iv) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones, introducir
- 45 secuencias codificantes para dominios funcionales o enlazadores peptídicos; y/o para añadir o para optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el huésped es una célula animal.
- 50 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en proteínas extracelulares y proteínas, polisacáridos, lipopoliproteínas y lipopolisacáridos, que son secretados, están asociados o unidos a una membrana o transmembrana.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste de leucotrienos, linfoquinas, citoquinas, interleuquinas, interferones y quimioquinas.
- 55 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la etapa de mezclar el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 11. Procedimiento para preparar un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para uso farmacéutico o como diana para la intervención terapéutica, que comprende las etapas del procedimiento, según cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 10, opcionalmente en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo está marcado de forma detectable o está unido a un dominio funcional o fármaco, preferiblemente en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

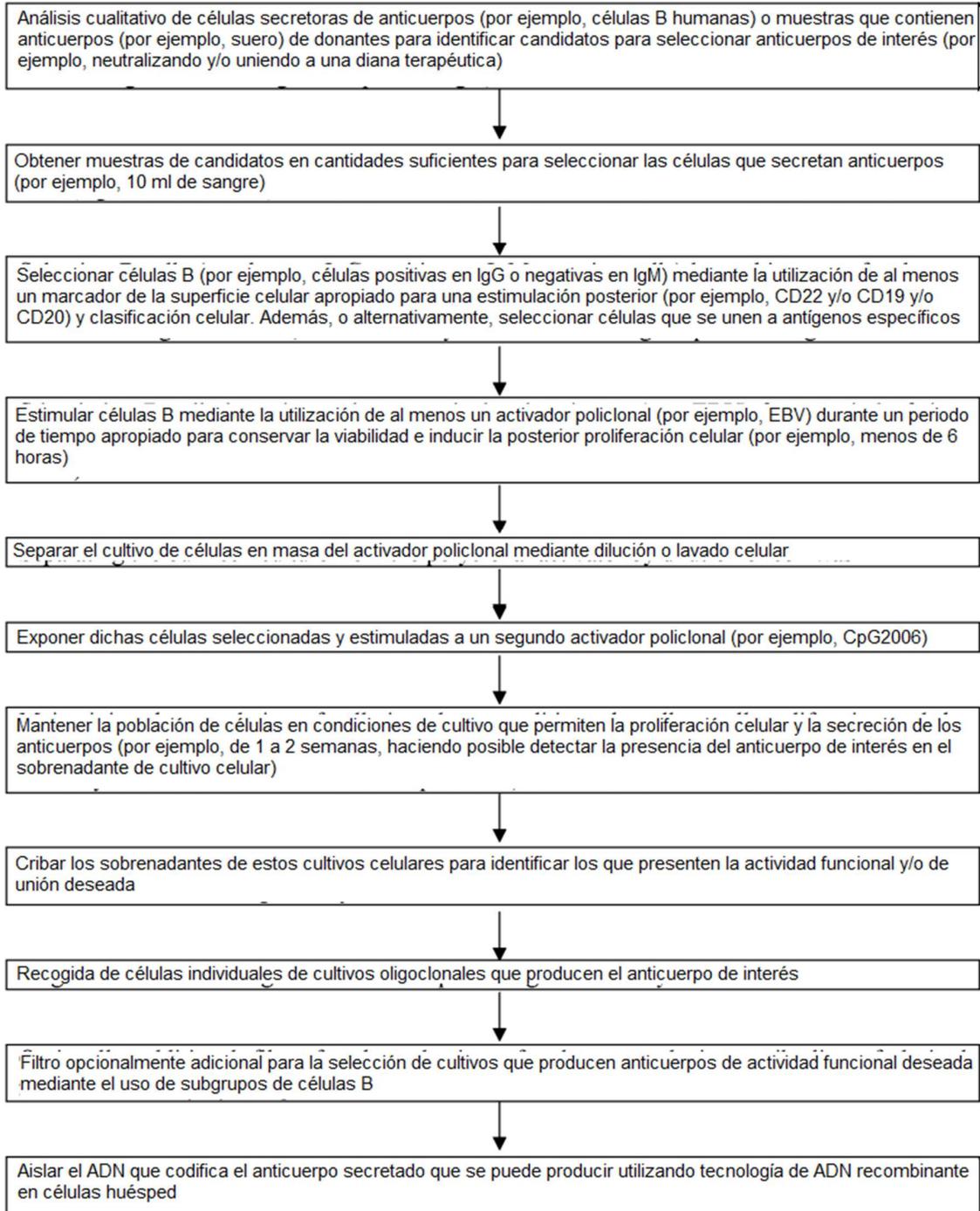


Figura 1

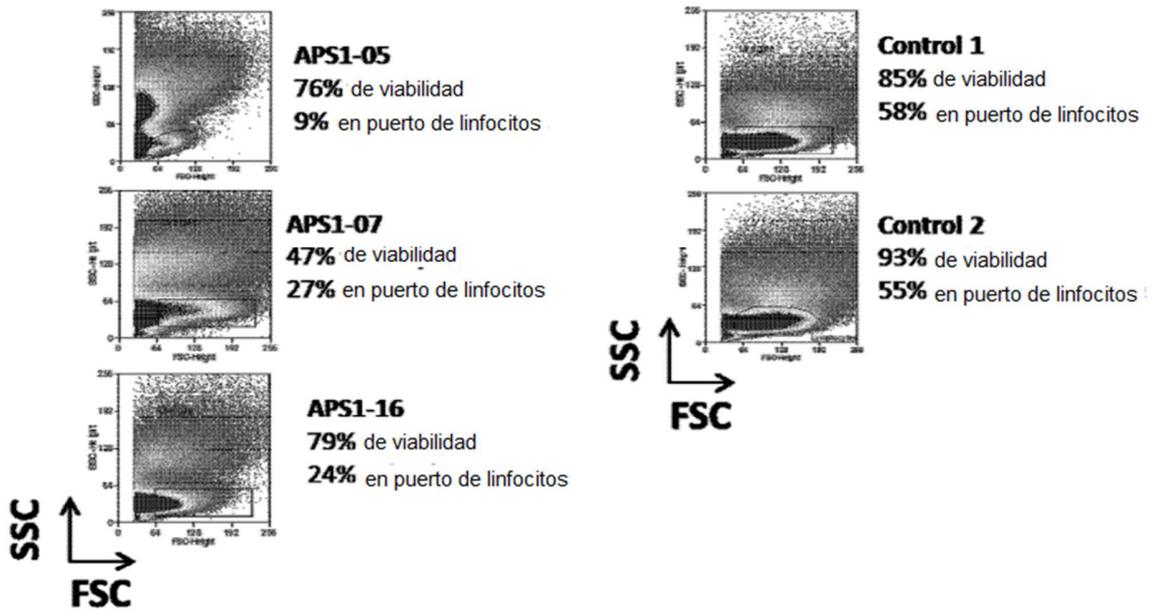


Figura 2

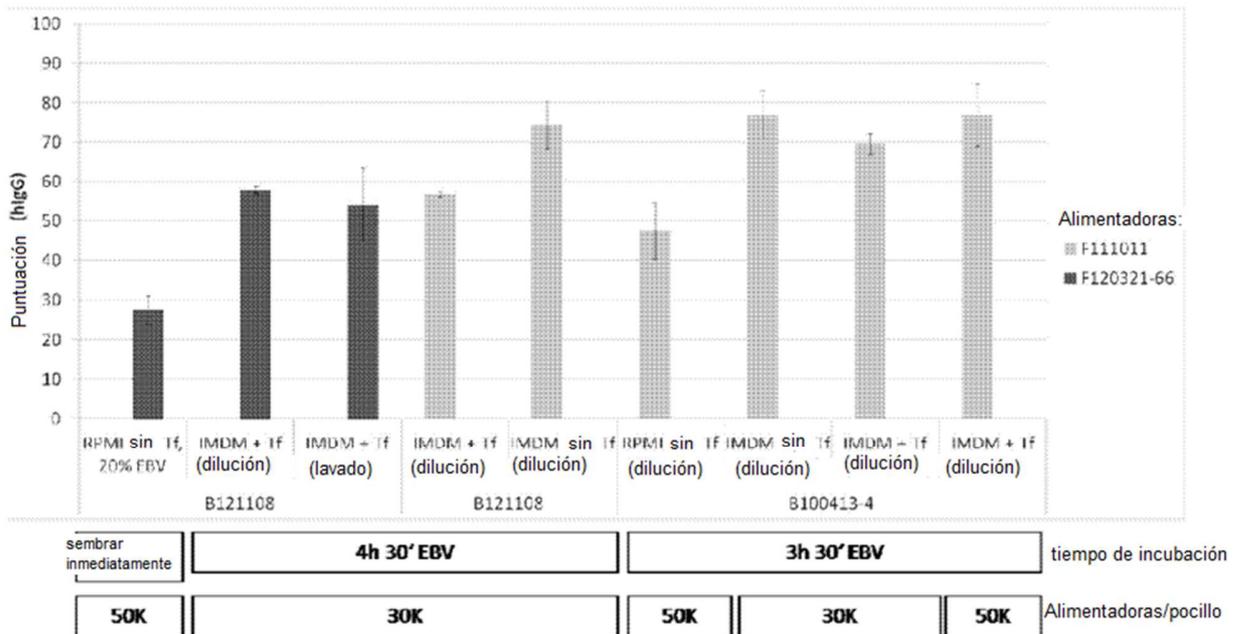


Figura 3

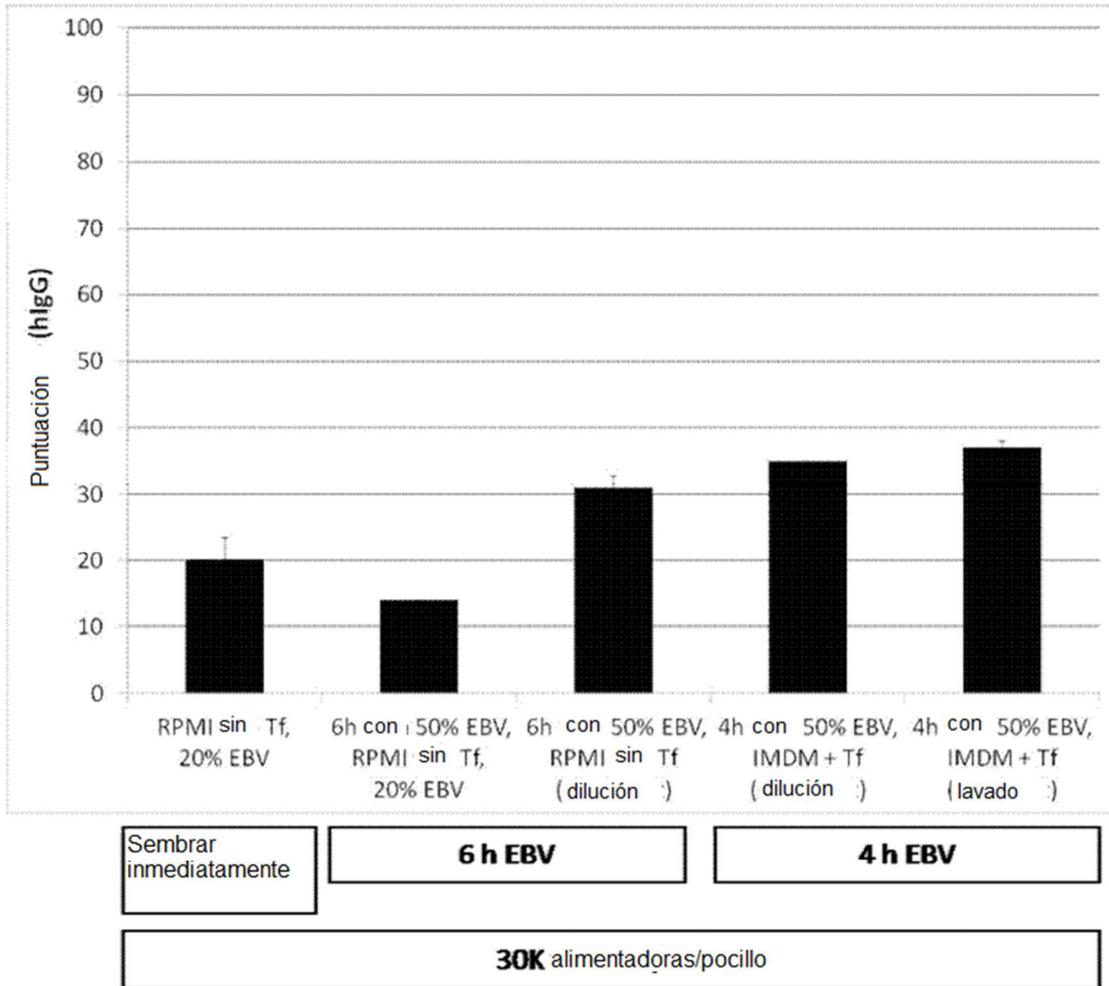


Figura 4

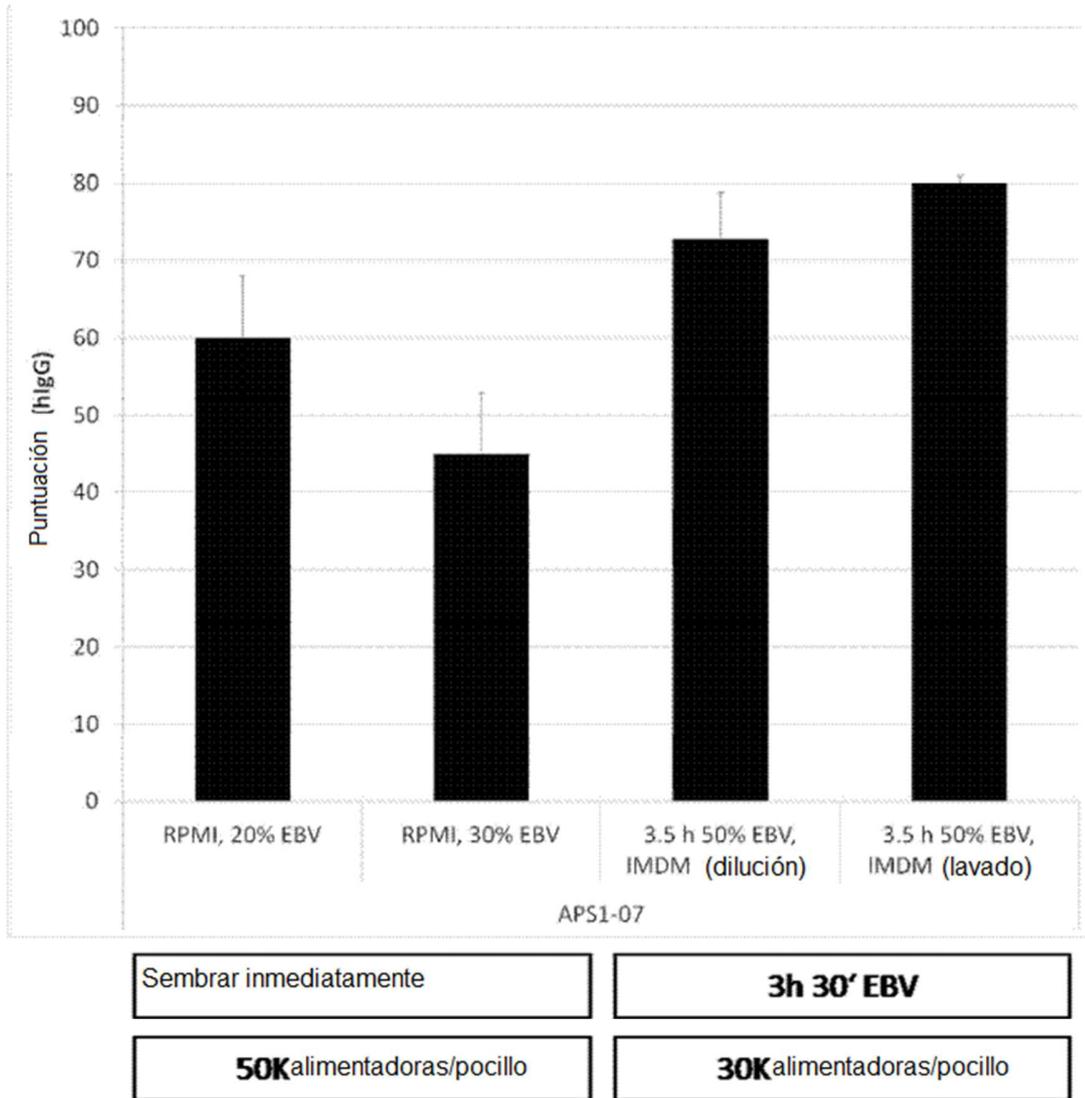


Figura 5

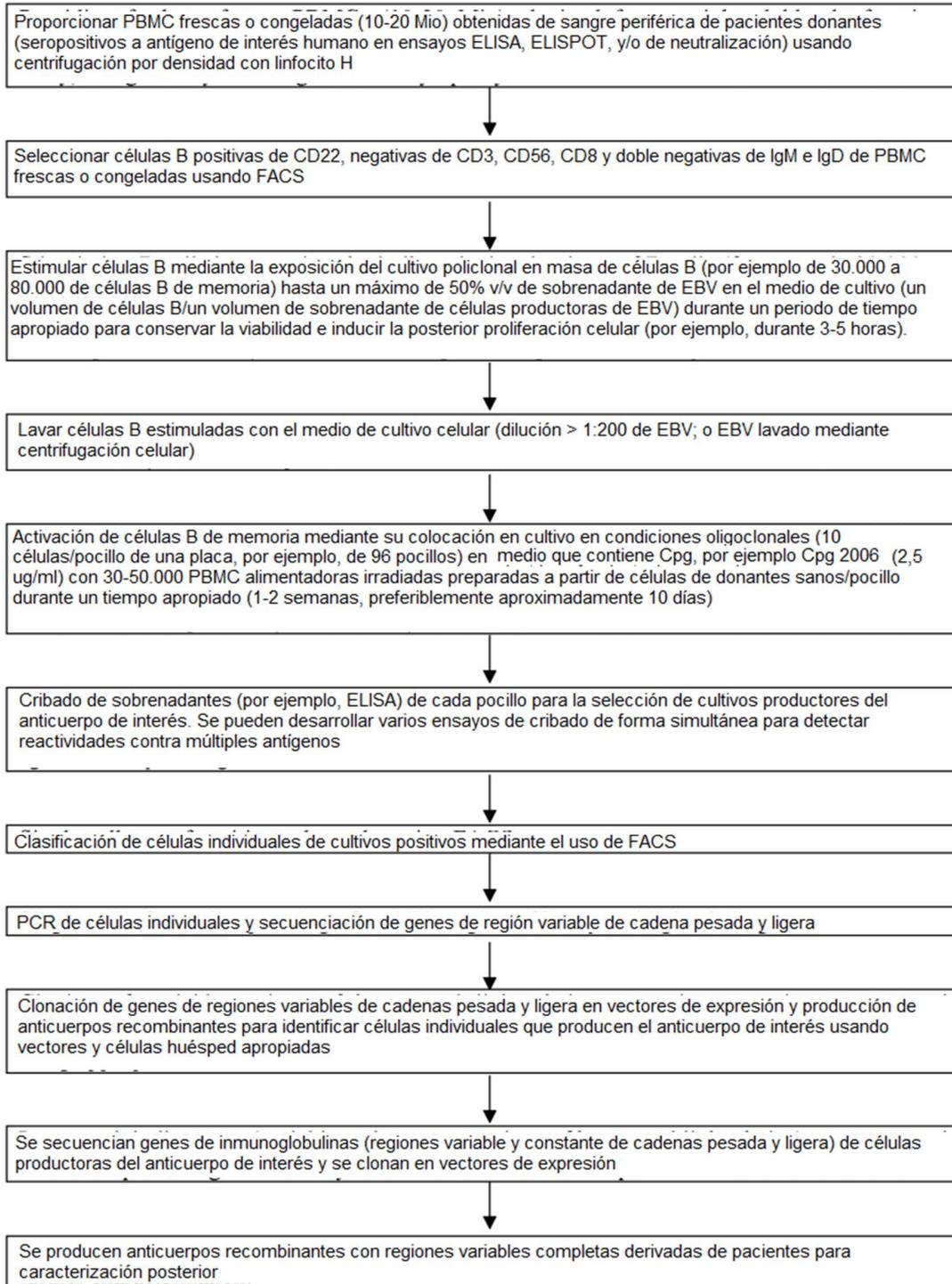


Figura 6