

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 303**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016** **E 16165226 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 3231814**

54 Título: **Un método para producir células B específicas de antígeno y su uso para la producción de células de hibridoma y anticuerpos monoclonales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2020

73 Titular/es:

**BIOGENES GMBH (100.0%)
 Köpenicker Str. 325
 12555 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

SCHMECHEL, DETLEF, DR.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 793 303 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

Un método para producir células B específicas de antígeno y su uso para la producción de células de hibridoma y anticuerpos monoclonales

5 La invención se refiere a un método no terapéutico para producir células B específicas de antígeno usando la transferencia celular adoptiva de células B cebadas, especialmente de las células del bazo incluyendo las células B de un animal no humano previamente inmunizado y mediante la administración de un antígeno de interés a un animal no humano no previamente expuesto. Estas células B cebadas (para transferencia), así como las células B activadas por antígeno (*de novo*) del animal inmunizado (las propias células B del receptor) se aíslan de un animal no humano inmunizado con el antígeno de interés. Las células B específicas de antígeno producidas pueden proporcionar anticuerpos monoclonales mediante el uso de la bien conocida tecnología de hibridoma. También se describen células de hibridoma y anticuerpos monoclonales producidos usando las células B específicas de antígeno.

15 Se induce una fuerte respuesta de anticuerpos en un animal hospedador mediante la activación de células B reactivas a antígeno y su diferenciación terminal en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Este proceso de activación y diferenciación está altamente influenciado por la inmunogenicidad del antígeno y la colaboración celular eficiente entre las células B y las células T auxiliares. Debido a su capacidad para unirse selectivamente a un antígeno de interés, los anticuerpos se han usado ampliamente para aplicaciones de investigación, de diagnóstico y terapéuticas. El uso potencial de anticuerpos se expandió con el desarrollo de anticuerpos monoclonales. A diferencia del antisero policlonal, que comprende una mezcla de anticuerpos dirigidos contra múltiples epítopos, los anticuerpos monoclonales se dirigen contra un único determinante o epítipo en el antígeno y son homogéneos. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cantidades ilimitadas. El trabajo seminal de Köhler y Milstein [Köhler y Milstein *Nature* 256:495 (1975)] describe el método original para obtener células de hibridoma que pueden producir anticuerpos monoclonales. Una célula secretora de anticuerpos, aislada de un ratón inmunizado, se fusiona con una célula de mieloma, un tipo de célula B cancerosa. Las células híbridas resultantes (hibridomas) son inmortales y secretan continuamente anticuerpos específicos con características reproducibles.

30 El éxito de la técnica original de hibridoma basada en la fusión celular depende en gran medida de una fuerte respuesta inmunológica celular en el bazo en el momento de la extracción del bazo para la producción de hibridoma. Ya que esta técnica usa una suspensión completa de células del bazo y debido a que todos los tipos de células se immortalizan de manera similar por fusión celular, es crítico que la proporción de células B específicas de antígeno en la población celular total en la suspensión de células del bazo sea lo más alta posible. Cuantas más células B específicas estén presentes en el momento de la fusión celular, mayores son las posibilidades de generar hibridomas específicos de antígeno diana.

40 Típicamente, la decisión de proceder a la generación de hibridoma depende de alcanzar un título predeterminado después de la inmunización de ratón con un antígeno diana dado. Cualquier título puede deberse a la presencia de un número relativamente bajo de anticuerpos de alta afinidad/avidez o la presencia de altos números de anticuerpos de baja afinidad/avidez. Después de alcanzar el título especificado, los ratones apropiados se seleccionan para la generación de hibridoma. Típicamente, 3-4 días antes de la fusión celular programada, los ratones seleccionados finalmente se refuerzan con antígeno y se extrae el bazo y se procesa el día de la generación del hibridoma. Sin embargo, si los títulos de anticuerpos específicos de antígeno en el momento del refuerzo final siguen siendo muy altos, el antígeno inyectado y los anticuerpos preexistentes pueden formar inmediatamente complejos solubles que son eliminados por los sistemas fagocíticos reticuloendoteliales y monocitos/macrófagos antes de que el antígeno inyectado sea capaz de activar las células B específicas de antígeno que residen en el bazo o de circular como células B de memoria en la periferia. Además, Se sabe que los complejos antígeno-anticuerpo suprimen las respuestas inmunológicas en curso mediante la activación de receptores inhibitorios de FcγRIIb en las células B y, de esta manera, previenen su activación y proliferación. Esta inhibición es parte de una respuesta fisiológica para terminar las respuestas inmunológicas y prevenir el desarrollo de respuestas autoinmunológicas. Adicionalmente, en las respuestas inmunológicas de memoria, es probable que se produzcan anticuerpos interferentes pero específicos por las células plasmáticas de la médula ósea como un sitio prominente de producción de anticuerpos a largo plazo y, por lo tanto, el bazo puede contener realmente un número bajo de células B específicas de antígeno en caso de respuestas de anticuerpos maduros. Bajos números generales de células B productoras de anticuerpos específicos en bazos de donantes combinados con iniciación *de novo* y amplificación pobres de las respuestas de células B de memoria derivadas de la circulación debido a anticuerpos preexistentes pueden considerarse razones principales para el fracaso en el aumento de la proporción de células B específicas en la suspensión final de células de bazo y, de esta manera, se reducen o se comprometen las posibilidades de generación exitosa de hibridoma.

60 El enfoque más común para evitar los efectos negativos de los títulos altos de anticuerpos preexistentes es esperar hasta que los anticuerpos específicos de antígeno diana, incluyendo los anticuerpos específicos de vehículo en el caso de conjugados de antígeno, hayan caído significativamente. Solo entonces puede el antígeno recién administrado, es decir, el refuerzo final, dar como resultado una acumulación significativa de antígeno en el bazo para facilitar la proliferación *de novo* de células B con cinética celular compatible con la generación exitosa de hibridoma. Desafortunadamente, el tiempo requerido para que los títulos altos de anticuerpos disminuyan lo

suficiente puede llevar varias semanas o incluso meses. En muchas situaciones, sin embargo, la inmunización de ratones con altos títulos de anticuerpos preexistentes puede permitir la activación de un número limitado de células B específicas de antígeno y, por lo tanto, generar un número limitado de hibridomas.

5 Los anticuerpos preexistentes, de esta manera, se consideran una de las principales razones del fracaso para inducir la proliferación celular extensa en la preparación para la producción de hibridoma. Por lo tanto, el objeto general de la presente invención es desarrollar un método para evitar los efectos negativos de la interferencia de anticuerpos y, de esta manera, aumentar la probabilidad de una generación exitosa de hibridoma.

10 Se descubrió que la proliferación celular específica en el bazo de animales no humanos singénicos sin exposición previa aumenta potencialmente después de una transferencia celular adoptiva de células de bazo obtenidas de animales no humanos previamente inmunizados con el antígeno de interés. Las células B específicas de antígeno se amplifican en un animal receptor no humano a números a menudo suficientemente altos para la generación exitosa de células de hibridoma. Es probable que la proliferación de células B observada en este enfoque esté facilitada por
15 la ausencia de anticuerpos interferentes. Debido a la transferencia de células entre animales, el enfoque se llama transferencia celular adoptiva.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método no terapéutico para la producción de células B específicas de antígeno usando transferencia celular adoptiva. El método comprende las siguientes etapas:

- 20
- a) Se generan células B preparadas de animales no humanos inmunizados. Las células B cebadas se aíslan de animales no humanos previamente inmunizados con el antígeno de interés.
 - b) Estas células B cebadas y el antígeno de interés se administran a un animal no humano no expuesto previamente para inducir una respuesta inmune humoral contra el antígeno de interés.
 - 25 c) Las células B específicas de antígeno se aíslan del animal receptor no humano.

Los animales no humanos son preferentemente mamíferos tales como roedores, ratones, ratas, cobayas, conejos, bovinos, caballos, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos. Los animales son animales inmunológicamente vírgenes con respecto al antígeno diana y están, de esta manera, libres de cualquier anticuerpo contra el antígeno de interés.
30 Los animales no humanos que se usan preferentemente son ratones o ratas, prefiriéndose ratones sobre ratas.

Las células B cebadas para la transferencia de células adoptivas se obtienen de animales no humanos previamente inmunizados. Después de la inmunización de acuerdo con los protocolos convencionales, las células del animal hospedador se recolectan para obtener poblaciones celulares de células B cebadas. Las poblaciones celulares recolectadas pueden aislarse de cualquier órgano de animales no humanos inmunizados y típicamente incluyen
35 el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, el epiplón, los Parches de Peyer o sangre y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células pueden cosecharse de más de una fuente y agruparse antes del procesamiento. Preferentemente, las células del bazo son las células animales hospedadores preferidas. Especialmente las células del bazo que incluyen las células B se usan como células B cebadas, las células del bazo se aíslan de animales no humanos previamente inmunizados con el antígeno de interés.
40

Las células a transferir pueden ser células recién aisladas o resucitadas de una solución madre celular congelada de animales no humanos previamente inmunizados, es decir, la fuente de las células a transferir pueden ser células de bazo frescas o resucitadas. La inmunización de los animales no humanos para proporcionar células B cebadas se realiza típicamente de acuerdo con protocolos convencionales usando el antígeno de interés. Eso significa que la
45 inmunización puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, tales como, mediante una o más inyecciones del antígeno de interés con o sin ningún agente para mejorar la respuesta inmunológica, tales como adyuvante de Freund completo o incompleto o cualquier otro adyuvante, u homogeneizando una lámina de gel que contiene el antígeno. Cuando se mide un título de anticuerpos suficiente en el suero, los ratones inmunizados se sacrifican y se aíslan las células que se utilizarán para la transferencia.
50

En una realización de la invención, las células B cebadas a administrarse al animal no humano receptor no expuesto previamente se pre-tratan por lavado en medio de cultivo celular libre de suero y por lisis de los glóbulos rojos. Por ejemplo, las células aisladas se suspenden en un volumen total de 50 ml de medio de cultivo celular libre de suero y se centrifugan. El sedimento resultante se resuspende en tampón de lisis de glóbulos rojos durante 1 min antes de
55 añadir medio sin suero a un volumen total de 50 ml. Se toma una alícuota de la suspensión celular resultante para el recuento celular usando preferentemente un hemocitómetro. La suspensión libre de glóbulos rojos de las células B cebadas se sedimenta nuevamente por centrifugación y el sedimento finalmente se resuspende en solución salina fisiológica en un volumen dependiente del número de células adecuado para la transferencia celular.
60

En una realización de la invención, las células B cebadas se administran al animal no humano sin experiencia previa a la administración del antígeno de interés para provocar una respuesta inmune humoral en el animal receptor. Aunque el antígeno puede administrarse en cualquier momento después de la transferencia celular, la inyección de antígeno se realizará típicamente en o poco después de la transferencia celular, es decir, dentro de 1-2 h.
65

Tal enfoque es especialmente ventajoso ya que los animales receptores no tienen ningún anticuerpo específico

5 contra el antígeno de interés en el momento de la transferencia de células adoptivas. El antígeno de interés dado poco después de la transferencia de células B cebadas puede activar directamente las células B de memoria transferidas mientras están en tránsito, especialmente al bazo o después de su llegada al bazo. El bazo del animal receptor no humano se ha demostrado anteriormente como uno de los principales órganos para la proliferación de las respuestas inmunológicas. Por lo tanto, la extensa proliferación celular, especialmente en el bazo, generará un conjunto significativo de células B específicas de antígeno en el bazo del animal receptor no humano y puede usarse para la producción de hibridomas.

10 La administración de células B cebadas y del antígeno de interés para el animal no humano sin exposición previa puede realizarse mediante inyección. Después de la inyección, preferentemente en la cavidad peritoneal, las células transferidas y el antígeno drenan hacia el bazo a través del sistema linfático subdiafragmático y el suministro de sangre. Como alternativa, pueden usarse otras vías tales como inyección intravenosa, subcutánea, intralinfática, etc.

15 Normalmente, siete días después de la transferencia de las células B cebadas y el antígeno de interés, la extensión del desarrollo de la respuesta inmunológica en los animales receptores se determina midiendo sus títulos de anticuerpos. Se toman muestras de sangre y los títulos de anticuerpos en suero se determinan mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o cualquier otra técnica de inmunoensayo adecuada. Si los títulos de anticuerpos se consideran ser lo suficientemente altos, puede llevarse a cabo una fusión celular. Si el título es demasiado bajo, los animales pueden reforzarse a intervalo o intervalos dependientes de antígeno hasta que se logre una respuesta adecuada, según lo determinado por muestras repetidas de sangre y mediciones de títulos. Típicamente, después de un período de descanso de 7-14 días después del último refuerzo de antígeno, los animales están listos para la generación de hibridoma.

25 El antígeno de interés puede ser cualquier sustancia a la que se pueda unir un anticuerpo e incluye, entre otros, péptidos o conjugados de péptidos, proteínas o fragmentos de las mismas; hidratos de carbono; moléculas o haptenos orgánicos e inorgánicos; receptores producidos por células animales, células bacterianas y virus; enzimas; agonistas y antagonistas de rutas biológicas; hormonas; ácidos nucleicos, lípidos, nanopartículas y citocinas.

30 Para poder funcionar como antígeno, las moléculas de bajo peso molecular (como haptenos, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, ciertas toxinas o principios activos) deben combinarse con proteínas vehículo inmunogénicas. La tiroglobulina bovina, la ovoalbúmina y la albúmina sérica bovina, así como la proteína del caracol hemocianina de lapa californiana (KLH) son proteínas vehículo comúnmente utilizadas para la generación de anticuerpos. Los antígenos preferidos son proteínas y conjugados peptídicos. Las proteínas vehículo preferidas son tiroglobulina bovina (peso molecular: 660-690 kDa) o KLH (peso molecular: ca. 390 kDa).

35 Las células B específicas de antígeno generadas en el animal receptor no humano pueden aislarse de cualquiera de los órganos del animal. Típicamente, las células B específicas de antígeno se obtienen del bazo, la sangre y/o cualquier otro órgano linfóide primario (médula ósea) o secundario, tales como los ganglios linfáticos, los vasos linfáticos, los parches de Peyer, el epíplon, etc.

40 La producción de hibridoma se lleva a cabo de acuerdo con protocolos convencionales. Para generar líneas celulares de hibridoma que produzcan anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno de interés, las células B específicas de antígeno se fusionan con células de mieloma. Los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales específicos se identifican, se aíslan y se crecen a granel *in vivo* como cultivos de ascitis o *in vitro* utilizando una diversidad de técnicas de cultivo de tejidos.

50 La fusión celular, la selección y clonación de las células de un hibridoma se realiza siguiendo protocolos convencionales como se describe, por ejemplo, en Peters, J. H. y Baumgarten, H. (Hersg.), Monoklonale Antikörper Herstellung und Characterisierung, 2. Auflage (1990), Springer Verlag o Harlow, E. y Lane, D., Antibodies A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor Laboratory.

55 La fusión celular suele estar mediada por fusógenos químicos tales como el polietilenglicol, pero también son posibles los virus fusogénicos o la electroporación. Después de la fusión celular, las células se suspenden en un medio de crecimiento selectivo compuesto por medios de crecimiento celular convencionales tales como el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), cada uno suplementado con HAT (hipoxantina-aminopterina-timina). El medio selectivo solo permite que las células híbridas sobrevivan. La suspensión celular se coloca en placas en pocillos de placas de cultivo de tejidos que habían sido recubiertos previamente el día anterior con células de exudado peritoneal como células alimentadoras. En lugar de células alimentadoras, sin embargo, pueden usarse diversos aditivos disponibles en el mercado para mejorar el crecimiento de los híbridos. Típicamente, después de dos semanas de cultivo celular, los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en crecimiento en cada pocillo ELISA se prueban para detectar la presencia de anticuerpos específicos de antígeno usando una diversidad de inmunoensayos tales como ELISA, micromatrices de antígenos de técnicas de inmunotransferencia. Todas las células de los pocillos con anticuerpos específicos se clonan mediante dilución limitante (aislamiento de células individuales mediante dilución) y los hibridomas recién crecidos derivados de pocillos con una colonia de células individuales (monoclonales) vuelven a probarse para detectar la presencia de anticuerpos específicos. El hibridoma más productivo y estable finalmente se selecciona entre todos los hibridomas

positivos al antígeno. Los hibridomas seleccionados se criopreservan para almacenamiento a largo plazo y los anticuerpos específicos se cultivan en masa usando una diversidad de técnicas *in vivo* o *in vitro* previas a la purificación de anticuerpos usando diversas técnicas de cromatografía de afinidad basadas entre otras en la proteína A o G.

5 También se desvelan células de hibridoma y anticuerpos monoclonales basados en células B específicas de antígeno producidas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

10 El número de células de hibridoma generadas usando células B específicas de antígeno producidas de acuerdo con la presente invención puede ser mucho mayor que las generadas con la técnica convencional. El método de la presente invención es una técnica adicional valiosa para generar células de hibridoma contra antígenos con respuestas de anticuerpos de larga duración a concentraciones muy altas. Adicionalmente, El método puede resultar especialmente valioso en situaciones en donde la técnica convencional de producción de hibridoma no pudo generar ningún hibridoma apropiado, pero aún permitió la activación de un bajo número de células B específicas de antígeno que luego pueden amplificarse mediante el método descrito. Por otra parte, todas las células animales del hospedador congeladas aún disponibles que se depositaron como células de respaldo durante una fusión convencional previa pueden resucitarse y procesarse usando el método descrito.

20 Ejemplos

Materiales

BALB/c (8 a 12 semanas de edad) comprado en JANVIER LABS

Los antígenos 4, 5 y 6 siendo péptidos acoplados a tiroglobulina bovina, las soluciones de antígeno se usan en solución salina fisiológica a 1 mg/ml, (los antígenos insolubles se inyectan como suspensión)

25 Adyuvante completo de Freund, (CFA o FCA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA o FIA)

Tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC)

Células de mieloma SP 2/0-Ag-14 adquiridas de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE)

30 Ejemplo 1

Preparación de células B específicas de antígeno usando transferencia celular adoptiva de células de bazo de ratones previamente inmunizados y administración de un antígeno de interés a ratones sin tratamiento previo

35 La transferencia celular se realiza con células de bazo recién aisladas que contienen poblaciones de células de bazo que incluyen células B cebadas de ratones previamente inmunizados o células de bazo resucitadas de reservas de células de bazo congeladas, es decir, células de bazo de reserva previamente aisladas de ratones inmunizados.

40 a) Inmunización de ratones con antígeno 4, 5 o 6 (véase la Tabla 1) para la generación de hibridoma usando el protocolo convencional y la provisión de células B cebadas para usarse para la transferencia de células adoptivas.

45 Para cada antígeno, se inmunizan 5 ratones con el antígeno. Los animales reciben inyecciones semanales del antígeno de interés emulsionado en volúmenes iguales de antígeno y adyuvantes de Freund. El adyuvante completo de Freund solo se usa para la primera inmunización. Las inmunizaciones posteriores se realizan con adyuvante incompleto de Freund. La última inmunización se realiza en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica. También pueden usarse adyuvantes alternativos tales como Ribí, TiterMax o Alum. En el transcurso del programa convencional de inmunización de 6 semanas, cada ratón generalmente recibe un total de cuatro a cinco inyecciones. El título de la respuesta inmune se mide típicamente después de la tercera inyección y cada inmunización posterior. Se aíslan células de bazo frescas y se usan alícuotas inmediatamente para la producción de hibridoma usando la técnica estándar o procesadas para la transferencia de células adoptivas. Las células sobrantes adicionales se congelan como celdas de respaldo para su posterior procesamiento si es necesario.

55 b) Transferencia de células de bazo recién preparadas a ratones sin exposición previa y su posterior inmunización con el antígeno 4 o 6 para generar hibridomas por el método de transferencia adoptivo.

60 Inmediatamente después de la fusión celular convencional, una alícuota de 150×10^6 células de la misma población de células de bazo usadas en la etapa (a) se lavan en un tubo de centrifuga de 50 ml mediante centrifugación en 50 ml de medio de cultivo celular libre de suero a 200 xg durante 8 min a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspende en 3,5 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos, y después de 1 minuto de incubación se añade medio de cultivo sin suero, hasta un volumen final de 50 ml. Se toma una alícuota de 200 μ l de la suspensión celular resultante para el recuento celular usando un hemocitómetro y la suspensión celular se centrifuga nuevamente. El sedimento celular final se resuspende en solución salina fisiológica y el número de células se ajusta a $50 \times 10^6/200 \mu$ l. Un grupo de ratones sin exposición previa (típicamente dos ratones) se inyecta por vía intraperitoneal con 200 μ l/animal de suspensión celular, seguido de 25-100 μ g/animal de antígeno 4 o 6, también en solución salina fisiológica, 1 hora después. Las inyecciones se llevan a cabo por vía intraperitoneal. Para monitorizar el desarrollo de la respuesta

5 inmunológica, los ratones receptores se desangran después de 1 semana y sus títulos de anticuerpos en suero se determinan mediante ELISA. Dependiendo del grado de la respuesta inmunológica observada, los ratones pueden reforzarse nuevamente a intervalo o intervalos dependientes de antígeno antes de finalmente usarlos para la producción de hibridoma de acuerdo con protocolos convencionales. Típicamente, después de un período de descanso de 7-14 días, los ratones están listos para recibir su refuerzo final para la generación de hibridoma. Sin embargo, en caso de títulos insuficientes de anticuerpos séricos, los ratones receptores pueden descansar (2-4 semanas) y reforzarse varias veces antes de medir nuevamente sus títulos de anticuerpos en suero.

10 c) Transferencia de células de bazo resucitadas a ratones sin tratamiento previo y su posterior inmunización con el antígeno 5 para generar hibridomas mediante el método de transferencia adoptiva usando solución madre de células de bazo congeladas.

15 Las células del bazo congeladas se descongelan y después se preparan de acuerdo con el procedimiento como se describe anteriormente en (b). Para la resurrección de las células del bazo, se recupera un vial criogénico del almacenamiento de nitrógeno líquido y las células se descongelan rápidamente en un baño de agua a 37 °C. El vial se transfiere del baño de agua a la campana de flujo laminar antes de que su contenido se descongele por completo. El momento adecuado para la transferencia del vial criogénico a la campana sería cuando el sedimento celular congelado en el vial criogénico invertido puede liberarse fácilmente desde el fondo del vial, es decir, cae dentro del vial después de un fuerte movimiento descendente repentino. En la campana, la superficie del vial se desinfecta con isopropanol al 70 % y se abre el vial. Las células en el sedimento celular que aún se está descongelando se resuspenden paso a paso (volúmenes de 0,5 ml) añadiendo y retirando múltiples medios de cultivo celular sin suero. Las alícuotas resultantes de 0,5 ml de células descongeladas se transfieren a 10 ml de medio de cultivo celular libre de suero y la suspensión celular se centrifuga a 200 xg durante 8 min a temperatura ambiente. El sedimento celular final se resuspende en 50 ml de medio de cultivo celular sin suero y las células se cuentan usando un hemocitómetro. Después de la lisis de glóbulos rojos, las células se procesan para la transferencia adoptiva como se describe anteriormente en b).

30 Ejemplo 2

Hibridoma y producción a granel de anticuerpos monoclonales

35 Después de la generación de hibridoma por transferencia adoptiva, los anticuerpos monoclonales se produjeron a granel usando técnicas de cultivo de tejidos convencionales *in vitro* y los anticuerpos se purificaron usando técnicas de cromatografía de afinidad convencionales antes de medir las concentraciones de anticuerpos por espectrofotometría.

Se determinaron las siguientes tasas de producción:

Antígeno 4: Hibridoma a: 17,4 µg/ml de IgG1/k
 Hibridoma b: 34,6 µg/ml de IgG1/k
 Hibridoma c: 51,4 µg/ml de IgG1/k
 Antígeno 5: Hibridoma a: 25,7 µg/ml de IgG1/k
 Hibridoma b: 20,6 µg/ml de IgG1/k
 Antígeno 6: Hibridoma a: 31,2 µg/ml de IgG2b/k
 Hibridoma b: 64,0 µg/ml de IgG1/k

40 La Tabla 1 compara los números de hibridomas generados por la técnica convencional y la técnica de transferencia celular adoptiva.

Tabla 1: Número de hibridomas primarios positivos para antígeno de acuerdo con el método de generación

	Número de cultivos primarios generados a través de:	
	Técnica convencional	Transferencia de célula adoptiva
Antígeno N.º 4	3	21
Antígeno N.º 5	20	30
Antígeno N.º 6	5	34

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para producir células B específicas de antígeno mediante el uso de transferencia celular adoptiva, en donde el método comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar células B cebadas aisladas de animales no humanos que se han inmunizado con un antígeno de interés;
- b) administración de las células B cebadas y el antígeno de interés a un animal no humano no expuesto previamente para inducir una respuesta inmune humoral contra el antígeno de interés,
- 10 c) aislamiento de células B específicas de antígeno del animal no humano de la etapa b).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células B cebadas son células de bazo que incluyen células B aisladas de animales no humanos que se han inmunizado previamente con el antígeno de interés.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células B cebadas a administrarse al animal no humano no expuesto previamente se tratan por lavado en medio de cultivo celular libre de suero y por lisis de los glóbulos rojos.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células B cebadas a administrarse al animal no humano no expuesto previamente se pre-tratan mediante:
- lavando las células B cebadas en medio de cultivo celular libre de suero;
 - sedimentando las células B cebadas por centrifugación;
 - 25 - resuspendiendo el sedimento celular obtenido usando tampón de lisis de glóbulos rojos;
 - añadiendo medio de cultivo sin suero;
 - sedimentando las células B cebadas por centrifugación; y
 - resuspendiendo el sedimento celular final en solución salina fisiológica.
- 30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células B cebadas se administran al animal no humano no expuesto previamente antes de la administración del antígeno de interés.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la administración de las células B cebadas y/o del antígeno de interés se realiza mediante inyección, por inyección intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intralinfática.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se monitoriza el desarrollo de la respuesta inmunológica en el animal no humano no expuesto previamente administrado con las células B cebadas y el antígeno de interés, los títulos de anticuerpos séricos en la sangre se determinan en puntos de tiempo predeterminados.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el animal no humano administrado con las células B cebadas y el antígeno de interés se refuerza mediante la administración adicional de antígeno de interés, el punto de tiempo para el refuerzo se determina dependiendo del grado de respuesta inmunológica observada.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el animal no humano a administrar con las células B cebadas y el antígeno de interés es un mamífero, seleccionado del grupo que consiste en un roedor, ratón, rata, cobaya, conejo, bovinos, caballo, perro, gato, cabra, oveja y cerdo.
- 50 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el antígeno de interés es uno seleccionado del grupo que consiste en péptidos o conjugados de péptidos, proteínas o fragmentos de las mismas; hidratos de carbono; moléculas orgánicas e inorgánicas; receptores producidos recombinantemente o por células animales, células bacterianas y virus; enzimas; agonistas y antagonistas de rutas biológicas; hormonas; ácidos nucleicos, lípidos, nanopartículas y citocinas.
- 55 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las células B cebadas se aíslan del bazo, de sangre o cualquier otro órgano linfoide primario o secundario.
- 60 12. Un método para producir una célula de hibridoma, que comprende las etapas de:
- producción de células B específicas de antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
 - fusionar una célula B específica de antígeno y una célula de mieloma, para preparar una célula de hibridoma que produce un anticuerpo específico para el antígeno de interés.
- 65 13. Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende las etapas de:

cultivar la célula de hibridoma producida por el método como se define en la reivindicación 12; y
obtener un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de interés del cultivo de la célula de hibridoma o la expresión recombinante de los genes del anticuerpo.