



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 585**

51 Int. Cl.:
C12N 5/074 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07725008 .2**

96 Fecha de presentación : **09.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2016099**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Método para la producción de anticuerpos en un animal inmunodeficiente en el que se han inyectado células madre de hígado fetal humano.**

30 Prioridad: **11.05.2006 EP 06009703**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4002 Basel, CH

72 Inventor/es: **Lifke, Alexander;**
Lifke, Valeria;
Mueller-Beckmann, Bernd y
Schnitzer, Tobias

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 359 585 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

Método para la producción de anticuerpos en un animal inmunodeficiente en el que se han inyectado células madre de hígado fetal humano

- 5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de anticuerpos, a composiciones de células productoras de anticuerpos, a métodos para su producción y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 Desde hace mucho tiempo los anticuerpos monoclonales (MAbs) han sido considerado "balas mágicas" en la inmunoterapia del cáncer, de la infección o de las enfermedad autoinmunitarias, etc. Sin embargo, la primera generación de anticuerpos murinos utilizada en el ser humano presentó relativamente poco éxito debido a las respuestas inmunológicas humanas anti-ratón.

- 15 Los anticuerpos humanos se han derivado mayoritariamente de ratones transgénicos que alojan un conjunto limitado de genes de Ig humana o de la selección de entre bibliotecas de gran tamaño de anticuerpos artificiales mediante expresión fágica, expresión en levaduras o mediante tecnologías recombinantes similares. Estas estrategias se han diseñado para eliminar cualquier reacción inmunológica contra el anticuerpo monoclonal en el fondo genético humano. Pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones transgénicos de la línea germinal resulta en la producción de anticuerpos humanos tras el reto antigénico (ver, por ejemplo, van Dijk M.A. y van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001; Jakobovits A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Bruggemann M. *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom H.R. y Winter G., J. Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks J.D. *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole *et al.* y de Boerner *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77, 1985; y Boerner, P. *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991). Sin embargo, dichos ratones transgénicos únicamente son capaces de proporcionar anticuerpos con un conjunto limitado de genes de Ig humana, aquellos que resultan del conjunto génico de inmunoglobulinas que se ha transfectado.

- 20 Las metodologías basadas en ratones transgénicos para genes de inmunoglobulina humanos han permitido generar anticuerpos derivados de una secuencia de línea germinal humana, que se ha informado que han reducido la inmunogenicidad de los fármacos de anticuerpos resultantes en comparación con los anticuerpos murinos y quiméricos de ratón-humanos. Sin embargo, los anticuerpos humanos derivados de ratones transgénicos presentan una diversidad, afinidades y especificidades limitadas en comparación con los repertorios inmunológicos humanos naturales.

- 35 La patente EP nº 0322240 da a conocer la detección de IgG humanas en ratones SCID tras la inyección intravenosa de células de hígado fetal humano en ratones SCID, siendo de por lo menos aproximadamente 3 semanas de edad, en los que se ha implantado timo y nódulo linfático fetales humanos.

- 40 La patente EP nº 1645183 da a conocer un método para generar inmunoglobulinas específicas de antígeno producidas por células B trasplantadas tras el trasplante de células hematopoyéticas humanas obtenidas de sangre del cordón en ratones NOD/SCID/βM neonatos inmunodeficientes. Se generaron inmunoglobulinas humanas, aunque a niveles diferentes en NOD/SCID/IL2rg-null y en NOD/SCID/β2m^{nu}.

- 45 De manera similar, una desventaja importante de los enfoques de biblioteca combinatorial basada en la expresión fágica o en levaduras es el apareamiento aleatorio de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo. La disociación del apareamiento original entre cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo, el apareamiento no afín, exige el cribado de un gran número de clones para identificar las parejas de cadena pesada y ligera de afinidad elevada. Además, dichas parejas no afines pueden mostrar reactividad cruzada no deseada con autoantígenos humanos. Finalmente, la diversidad genética de los anticuerpos específicos de diana identificados mediante selección y cribado de bibliotecas combinatoriales comúnmente se encuentra limitada a sesgos selectivos inherentes.

- 50 Traggai E. *et al.*, Science 304:104-107, 2004, describen un método para el desarrollo de un sistema inmunológico humano en ratones Rag 2^{-/-}yc^{-/-} trasplantados con células sanguíneas de cordón humano, que pueda utilizarse como modelo preclínico para evaluar las respuestas a vacunas o patógenos infecciosos vivos y a compuestos farmacológicos que presentan como diana el sistema inmunológico humano. Se demostró que ratones reconstituidos y posteriormente vacunados con patógenos podían producir respuestas de anticuerpos específicas de toxoide tetánico a niveles bajos.

Descripción resumida de la invención

- 5 La invención comprende un método para la producción de un anticuerpo monoclonal humano de un animal no humano inmunodeficiente, comprendiendo dicho método poner en contacto un animal no humano inmunodeficiente neonato con una célula madre de hígado fetal humano (célula FL) para generar un animal no humano transplantado inmune (animal reconstituido), poner en contacto posteriormente dicho animal reconstituido con un antígeno, recoger a partir de dicho animal reconstituido células humanas productoras de anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislar dicho anticuerpo respecto de dichas células productoras de anticuerpos.
- 10 La invención preferentemente comprende un método según la invención, caracterizado por el establecimiento a partir de dichas células productoras de anticuerpos, células inmortales productoras de anticuerpos, preferentemente mediante un método de transformación o un método de fusión celular. Preferentemente, dichas células inmortales son capaces de seguir siendo viables durante por lo menos 50 pases.
- 15 Preferentemente, dicho animal no humano es un roedor, y más preferentemente es un ratón, rata o conejo. Resulta adicionalmente preferente que el ratón sea un ratón Rag2^{-/-}γc^{-/-}, Rag 2^{-/-} desnudo, NOD ("NOD" se refiere según la invención preferentemente a NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Prf1^{tm1Sdz}/SzJ) o SCID beige, y la rata es una rata desnuda.
- 20 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque dicha célula FL es una célula madre hematopoyética de hígado fetal humano (célula HFL), preferentemente CD133⁺, CD117⁺, CD31⁺ y/o CD34⁺.
- 25 En una realización adicional, el método preferentemente se caracteriza porque dicha célula FL es una combinación de una célula HFL y una célula madre no hematopoyética de hígado fetal humano.
- 30 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque dichas células FL está destinado a la puesta en contacto de células inyectadas i.p., s.c. o intrahepáticamente en el animal.
- La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque el antígeno es un polipéptido, un complejo de MHC/péptido o ADN.
- 35 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque el antígeno se pone en contacto con el animal reconstituido a modo de antígeno, fragmento de antígeno, ADN codificante de antígeno y/o célula portadora de antígeno.
- 40 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque el animal no humano inmunodeficiente se irradia subletalmente antes de ponerlo en contacto con las células FL.
- La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque el ratón se pone en contacto en primer lugar con el antígeno 5 a 18 semanas después de poner en contacto dicho ratón con dichas células FL.
- 45 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque el ratón se pone en contacto hasta diez veces con el antígeno.
- La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque dichas células recogidas son células CD19⁺ o CD22⁺ humanas.
- 50 La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque dicha célula se establece mediante tecnología del hibridoma. La invención comprende un método según la invención, caracterizado porque la línea celular de pareja de fusión es una línea celular MFP-2, HK-128, K6H6/B5 o Karpas 707. La invención comprende un método para la producción de una pluralidad de células B humanas que producen una pluralidad completa de anticuerpos humanos contra un antígeno, caracterizándose dicho método por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con células FT, generando un animal inmunorreconstituido, poniendo en contacto seguidamente dicho animal reconstituido con un antígeno, recogiendo dichas células B humanas y produciendo dicha pluralidad completa de anticuerpos.
- 55 La invención comprende la utilización de un animal no humano para la producción de células inmortales productoras de antígenos según la invención. En el caso de que la célula inmortal sea una célula de hibridoma, uno de la pareja
- 60

de fusión para la generación de hibridoma es una célula B humana de dicho animal transplantado y reconstituido, y el otro de la otra pareja de fusión es una célula de mieloma, por ejemplo de ser humano, de roedor o de otro animal. Alternativamente, se generan células B inmortales transplantadas y reconstituidas mediante transformación de EBV.

5 Basándose en la invención resulta posible, por lo tanto, proporcionar una pluralidad de células B humanas que producen una pluralidad completa de anticuerpos humanos contra una proteína humana.

Basándose en la invención resulta posible, por lo tanto, proporcionar una composición de células inmortales que proporciona una pluralidad completa de anticuerpos humanos contra una proteína humana.

10 Basándose en la invención resulta posible, por lo tanto, utilizar un animal reconstituido para la producción de una pluralidad de células B inmortales, produciendo una pluralidad completa de anticuerpos humanos contra una proteína humana.

15 La invención comprende un método para la generación y producción de un anticuerpo monoclonal humano en un animal no humano, estando dirigido dicho anticuerpo contra una proteína humana (incluyendo fragmentos) que es por lo menos 80% homóloga (BLAST) respecto a la proteína correspondiente de dicho animal no humano. Un ejemplo de lo anterior es CXCR5. La CXCR5 humana y murina son homólogas al 84%. Por lo tanto, la invención proporciona un método para generar anticuerpos humanos contra proteínas o regiones de proteínas altamente conservadas, aunque la proteína o fragmento de la misma sea homóloga por lo menos al 95% o más entre el ser humano y dicho animal no humano, o incluso homóloga al 100%.

20 Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención es un anticuerpo monoclonal humano específico para una proteína humana que presenta una homología de por lo menos 95%, preferentemente 98%, e incluso 100% (BLAST) respecto a la proteína correspondiente de un animal no humano, preferentemente el ratón, la rata y/o el conejo. Un objetivo preferente de la invención es un anticuerpo monoclonal humano específico para una proteína humana que presenta una homología de por lo menos 95%, más preferentemente 98%, e incluso 100% (BLAST) respecto a la proteína murina (de ratón) correspondiente.

30 La invención comprende un método para la producción recombinante de un anticuerpo, caracterizado por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con células FL, seguidamente poniendo en contacto dicho animal no humano con un antígeno, recogiendo a partir de dicho animal no humano unas células humanas que producen anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislando dicho anticuerpo, secuenciando las regiones variables, construyendo uno o más vectores de expresión codificantes de por lo menos las CDRs de cadena pesada y/o ligera, en combinación con una cadena constante humana, expresando dicho vector o vectores en una o más células huésped apropiadas, y aislando dicho anticuerpo (proteína inmunorreactiva) a partir de dicha célula o células huésped o sobrenadante de fermentación.

40 La invención comprende un método para la producción recombinante de un anticuerpo, caracterizado por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con unas células FL, caracterizado por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con células FL, seguidamente poniendo en contacto dicho animal no humano con un antígeno, recogiendo a partir de dicho animal no humano unas células humanas que producen anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislando ARNm de dichas células humanas productoras de anticuerpos humanos, generando ADNc específico de anticuerpo (por ejemplo mediante la utilización de cebadores específicos de inmunoglobulina), construyendo uno o más vectores de expresión codificantes de por lo menos las CDRs de las cadenas pesada y/o ligera, en combinación con una cadena constante humana que expresa dicho vector o vectores en una o más células huésped apropiadas, y aislando dicho anticuerpo (proteína inmunorreactiva) de dicha célula o células huésped o sobrenadante de fermentación.

50 Basándose en la invención resulta posible, por lo tanto, seleccionar células inmortales productoras de anticuerpos humanos que muestran unión específica a un antígeno, estando caracterizado dicho método porque proporciona una pluralidad de células B humanas procedentes del bazo de un animal no humano que producen una pluralidad completa de anticuerpos humanos, fusionando dichas células o un subconjunto de las mismas con células de mieloma inmortales, o inmortalizando dichas células B o subconjunto de las mismas mediante transformación de EBV, y seleccionando unas células de hibridoma productoras de un anticuerpo humano que muestra unión específica a dicho antígeno.

60 Basándose en la invención resulta posible, por lo tanto, seleccionar células inmortales productoras de un anticuerpo que muestra una afinidad de unión específica de por lo menos 10^{-6} moles/l para un antígeno en una cantidad de por lo menos 1,5 Pg/ml, estando caracterizado dicho método porque proporciona una pluralidad de células B humanas procedentes del bazo de un animal no humano productoras de una pluralidad completa de anticuerpos humanos, fusionando dichas células o un subconjunto de las mismas con células de mieloma inmortales, o inmortalizando dichas células B o un subconjunto de las mismas mediante transformación de EBV, y seleccionando una célula de hibridoma productora de un anticuerpo que muestra una afinidad de unión específica de por lo menos 10^{-6} moles/l con un antígeno.

65

Preferentemente, la cantidad de anticuerpo aislado es de por lo menos 1,5 Pg/ml.

5 Preferentemente, el anticuerpo muestra una afinidad de unión específica de por lo menos 10^{-9} moles/l a dicho antígeno.

Descripción de la invención

10 La expresión "pluralidad completa" referida a anticuerpos humanos o a genes de inmunoglobulina humanos se refiere a anticuerpos o a genes de inmunoglobulina que comprenden o que codifican:

- cadenas kappa de por lo menos 20, preferentemente 31 a 33, genes kappa en 2p11 del cromosoma 2 (76 genes, de los cuales 31 a 35 son funcionales),

15 - cadenas lambda de por lo menos 20, preferentemente de 29 a 33, genes lambda en la posición 22q11 del cromosoma 22, y

- un gen J (existen 4 a 5 genes funcionales de cadena lambda, cada uno de los cuales se encuentra precedido por un gen J de lambda), y

20 - cadenas pesadas de por lo menos 5, preferentemente 9, genes de cadena pesada en 14q32 del cromosoma 14 (11 genes de cadena pesada, 9 de los cuales son funcionales y corresponden, respectivamente, a 9 isotipos de cadena pesada: P, δ , γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, α 1, α 2 and ϵ).

25 Por ejemplo, el antígeno puede ser una sustancia derivada de un ser humano, tal como una proteína, hormona, glucolípido asociado a tumor (por ejemplo ver la patente US nº 5.091.178) u otra sustancia implicada en el metabolismo humano natural. El antígeno también puede ser una sustancia derivada no humana que resulte tolerada por un ser humano sano, de manera que dicho ser humano no desarrolle anticuerpos de modo detectable contra dicho antígeno.

30 La expresión "proteína humana" (que incluye polipéptidos) se refiere a una proteína arbitraria de un ser humano que resulta naturalmente tolerada o atacada en enfermedades autoinmunitarias. La expresión "proteína humana" también incluye según los conocimientos del experto en la materia fragmentos de dicha proteína que son capaces de inducir anticuerpos específicos para dicha proteína humana en el animal no humano que resultan adecuados según la invención. Dichos fragmentos pueden incluirse, por ejemplo, en una proteína de mayor tamaño, por ejemplo es bien conocido que pueden inducirse algunos anticuerpos contra proteínas humanas mediante inmunización con una proteína homóloga procedente de otra especie, tal como el ratón. La proteína humana preferentemente es una proteína humana tolerada.

40 La expresión "proteína humana tolerada" se refiere a una proteína de un ser humano que resulta naturalmente tolerada y que no resulta atacada en enfermedades autoinmunitarias tales como el síndrome de Goodpasture, la diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), la anemia hemolítica inmunológica, la púrpura trombocitopénica inmunológica, la miastenia gravis (MG), la esclerosis múltiple (MS), la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (SLE) o la tirotoxicosis (enfermedad de Graves).

45 Por ejemplo, la proteína humana puede ser una molécula transmembranal (por ejemplo un receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Entre los antígenos ejemplares se incluyen moléculas tales como la renina, hormona de crecimiento, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, hormona estimuladora de la tiroides, lipoproteínas, antitripsina alfa-1, cadena A de la insulina, cadena B de la insulina, proinsulina, hormona foliculo-estimulante, calcitonina, hormona luteinizante, glucagón, factores de coagulación tales como el factor VIII, el factor IX, el factor tisular (TF) y el factor de von Willebrand, factores anticoagulación tales como la proteína C, factor natriurético atrial, surfactante pulmonar, un activador del plasminógeno tal como la uroquinasa o la orina humana o el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), bombesina, trombina, factor de crecimiento hematopoyético, factores alfa y beta de necrosis tumoral, encefalinasa, RANTES (regulada por activación, normalmente expresada en células T y secretada), proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), una albúmina sérica tal como la albúmina sérica humana, sustancia inhibidora Muelleriana, cadena A de la relaxina, cadena B de la relaxina, prorrelaxina, péptido asociado a gonadotropina de ratón, una proteína microbiana tal como la beta-lactamasa, ADNasa, IgE, antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA) tal como CTLA-4, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores de hormonas o de factores de crecimiento, proteína A o D, factores reumatoides, un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado óseo (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5 ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5 ó NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-b, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico tal como aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-b1, TGF-b2, TGF-

5 b3, TGF- β 4 ó TGF- β 5, un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF- α o TNF- β , factores I y II de crecimiento similar a insulina, proteínas ligantes de factor de crecimiento similar a insulina, proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD40, eritropoyetina, factores osteoinductores, inmunotoxinas, una proteína morfogénica ósea (BMP), un interferón tal como interferón- α , β y γ , factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo M-CSF, GM-CSF y G-CSF, interleuquinas (ILs), por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 e IL-10, superóxido dismutasa, receptores de células T, proteínas de superficie membranal, factor acelerador de la degradación, antígenos víricos tales como, por ejemplo, una parte de la cubierta del virus del SIDA, proteínas de transporte, receptores de localización, adhesinas, proteínas reguladoras, integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18 e ICAM, VLA-4 y VCAM, un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 ó HER4, y fragmentos de cualquiera de las proteínas anteriormente indicadas. Son proteínas humanas adicionales miembros de la familia del receptor ErbB, tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 ó HER4, un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral, incluyendo DR5, el antígeno de células madre prostáticas (PSCA), moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina α 4/ β 7 e integrina α v/ β 3, incluyendo subunidades α o β de las mismas (por ejemplo los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 ó anti-CD11b), factor tisular (TF), interferón α (IFN- α), una interleuquina, tal como IL-8, IgE, antígenos de grupo sanguíneo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB) o receptor mp1.

20 La expresión "célula inmortal" se refiere a una célula de hibridoma o a una célula inmortalizada por otro medio, tal como la transformación de EBV, la sustitución de telomerasas o la inmortalización mediante retrovirus.

El término animal tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un animal no humano, preferentemente un roedor, y resulta especialmente preferente un ratón o una rata.

25 Preferentemente, dicho animal no humano es un roedor, y más preferentemente es un ratón, rata o conejo. Resulta adicionalmente preferente que el ratón sea un ratón Rag2^{-/-} γ c^{-/-}, Rag 2^{-/-} desnudo, NOD o SCID beige y la rata es una rata desnuda.

30 El ratón SCID beige es un ratón doble mutante que porta la mutación scid que causa una falta de linfocitos tanto T como B debido a un defecto en la recombinación V(D)J. También porta la mutación beige, que resulta en defectos en las células T citotóxicas y en macrófagos, así como en la alteración selectiva de las funciones de las células NK. Los ratones SCID beige son potencialmente un modelo mejorado de receptores de células hematopoyéticas humanas.

35 Los ratones NOD preferentes son NOD.Cg-Rag1tm1MomPrf1tm1SdzlSzJ, NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ, NOD.129S7 (B6)-Rag1tm1Mom/J, NOD.Cg-PrkdcscidB2mtm1UnclJ y NOD.CB17-Prkdcscid/SzJ. Todas las cepas carecen de células T y B maduras y no presentan actividad citotóxica NK detectable. Las cepas permiten una injertación mejorada con células hematopoyéticas humanas, presentan una vida más prolongada y son significativamente más resistentes a la irradiación.

40 Rag2 resulta esencial para las reorganizaciones del gen V(D)J que generan receptores de antígeno funcionales en las células T y B; los mutantes Rag2^{-/-} homocigóticos no presentan células T y B funcionales maduras. El ratón KO γ c común no presenta receptores funcionales para muchas citoquinas, incluyendo IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. En consecuencia, el desarrollo de los linfocitos se ve muy comprometido. El ratón no presenta células asesinas naturales (NK) y produce sólo un número reducido de células T y B.

45 La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye anticuerpos que presentan regiones (dominios) variables y constantes que pueden asignarse a secuencias definidas de inmunoglobulina de línea germinal humana debido a su elevada similitud o identidad de secuencias con dichas secuencias de línea germinal. Un anticuerpo humano comprende las diversas formas de anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos completos, cadenas pesadas o ligeras individuales, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de clase alterada y anticuerpos genéticamente modificados (anticuerpos variantes o mutantes), con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención. Resultan especialmente preferentes los anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo en la que todas presentan sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos.

50 La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de una célula huésped, tales como las células NS0, HEK293 ó CHO que comprenden un vector de expresión recombinante capaz de expresar una o más cadenas pesadas y/o ligeras de dicho anticuerpo y transfectándolas en dicha célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos humanos recombinantes según la invención se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que pueden asignarse a secuencias definidas de la secuencia de línea germinal humana de V_H y V_L, aunque pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de

anticuerpos de la línea germinal humana.

La expresión "región variable" (región variable de una cadena ligera (V_L), región variable de una cadena pesada (V_H)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada una de las cadenas de la pareja de cadenas ligera y pesada que se encuentra implicada directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesada humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja β y las CDRs pueden formar bucles conectando la estructura de hoja β . Las CDRs en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDRs de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo, preferentemente la CDR3 de cadena pesada, desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte ligante de antígeno de un anticuerpo" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Los "dominios constantes" no se encuentran implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, aunque muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan μ , δ , γ , α y ϵ , respectivamente. Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

El aislamiento del anticuerpo a partir de la célula productora de anticuerpos, ascites y/o del sobrenadante puede llevarse a cabo según los métodos conocidos del estado de la técnica, tales como la cromatografía o la diálisis. Por ejemplo, el anticuerpo puede purificarse utilizando uno o más de los métodos seleccionados de entre purificación por inmutafinidad, precipitación con sulfato amónico, purificación con proteína A/G, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y/o precipitación con sulfato amónico. Dichos métodos se describen en Nau D.R., Optimization of monoclonal antibody purification, en: Techniques in Protein Chemistry, Hugli, T. (ed.), Academic Press, New York, 1989, páginas 339 a 347; Coligan J.E. *et al.* (editores), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2005.

En lugar de la generación de hibridoma, pueden utilizarse métodos alternativos para la producción de un anticuerpo según la invención. Dichos métodos se basan, por ejemplo, en la identificación de la secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo. Habitualmente resulta suficiente identificar la secuencia de las regiones variables, las regiones CDR o incluso únicamente la región CDR3 de cadena pesada. Preferentemente, se aísla ARNm de un grupo de células productoras de anticuerpos y se utiliza para construir un banco de ADNc codificante de dicha región o regiones en un vector de expresión apropiado. La biblioteca de ADNc se transfecta en las células huésped, tales como NS0 o CHO y se criba para la producción de anticuerpos específicos y se identifican clones específicos y se aíslan y se utilizan para la producción de anticuerpos sin generación de hibridoma.

Las células FL son células madre que son capaces de desarrollarse en diversos tipos celulares sanguíneos, por ejemplo células B, células T, granulocitos, plaquetas y eritrocitos. Las células madre hematopoyéticas de hígado fetal humano comúnmente expresan el antígeno o antígenos de superficie CD31, CD34, CD117 (c-kit) y/o CD133. Según la invención preferentemente se utiliza una célula FL que expresa CD133. Como célula FL también puede utilizarse una célula precursora (es decir, una célula madre embrionaria) que se desarrolle tras el tratamiento con citoquinas para formar una célula FL.

Las células FL que expresan CD133 pueden aislarse a partir del hígado fetal humano y se separan adicionalmente según el linaje CD133, preferentemente mediante un procedimiento de separación inmunomagnética, por ejemplo el "MACS[®] separation system" de Miltenyi. Otro método preferente para aislar células FL incluye las etapas adicionales de marcar los monocitos con un anticuerpo de CD133 conjugado con biotina y recuperar una población de células madre positiva para CD133.

Los ratones que portan una mutación null de la cadena gamma común (γ_c) de receptores de citoquinas en el

5 cromosoma X han sido descritos por DiSanto J.P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:377-381, 1995. Las hembras $\gamma c^{-/}$ pueden cruzarse con machos homocigóticos para una mutación que interrumpe el gen RAG2 (Shinkai Y. *et al.*, Cell 68:855-867, 1992). Los machos F1 heterocigóticos para la delección de RAG2 y hemocigóticos para la delección de γc pueden retrocruzarse en hembras $\gamma c^{-/}$ -RAG2^{+/+}. El genotipo RAG2 de la progenie resultante puede determinarse mediante PCR de cola de ADN (Horton R.M. *et al.*, BioTechniques 19:690-691, 1995). Se crían heterocigotos RAG2 para producir los ratones macho $\gamma c^{-/}$ -RAG2^{-/-} y $\gamma c^{-/}$ -RAG2^{-/-} (γc /RAG2). Estos ratones presentan un fondo mixto de 129 Ola, Balb/c y C57BL/6.

10 La inmunorreconstitución según la invención se realiza mediante trasplante de cantidades apropiadas de células FL humanas en el hígado de animales inmunodeficientes neonatos y pre-irradiados, por ejemplo ratones o ratas.

15 Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención pueden producirse mediante la inmunización de un animal no humano inmunorreconstituido según la invención, preferentemente un roedor inmunorreconstituido, más preferentemente una rata o ratón inmunorreconstituido, con una preparación purificada o enriquecida del antígeno, ácido nucleico codificante de dicho antígeno y/o células que expresan dicho antígeno. A continuación, se obtienen células B (por ejemplo células B esplénicas) y se fusionan con una pareja de fusión humana apropiada, tal como una célula de mieloma, formando células de hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno mediante la fusión con una pareja de fusión humana apropiada, tal como una célula de mieloma, o mediante inmortalización de dichas células con, por ejemplo, EBV. Por ejemplo, opcionalmente se conjugan antígenos solubles o fragmentos de los mismos, con otras moléculas, y se utilizan como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranales, tales como receptores, pueden utilizarse fragmentos de ellas (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor) como el inmunógeno. Alternativamente, pueden utilizarse células que expresan la molécula transmembranal como el inmunógeno. Dichas células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo de líneas de células cancerosas) o pueden ser células que han sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranal. Otros antígenos y formas de los mismos que resulten útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia.

30 Preferentemente, el animal no humano inmunorreconstituido presentara entre 6 y 16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida de ADN codificante del antígeno de interés (por ejemplo antígeno CD20 ó HER3) para inmunizar el animal no humano inmunorreconstituido según la invención intramuscularmente. Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización, obteniendo muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA y puede utilizarse plasma no humano inmunorreconstituido con suficientes títulos de anticuerpos contra dicho antígeno para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden recibir un refuerzo intravenoso con el antígeno de interés antes del sacrificio y extirpación del bazo y nódulos linfáticos y sangre periférica. Se encontró que podía resultar necesario llevar a cabo 2 a 3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varios ratones para cada antígeno.

40 Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una célula de mieloma humana o de heteromieloma utilizando PEG o electrofusión basada en protocolos estándares para la generación de hibridomas. La electrofusión se basa en un cambio estructural reversible de las membranas celulares, causado por los efectos de un campo eléctrico y aplicable a un amplio espectro de células, para la fusión de dos o más células del mismo origen o de orígenes diferentes, incluyendo sus estructuras completas (núcleo, membranas, orgánulos, plasma celular), con el fin de crear una nueva célula viable.

45 Los hibridomas resultantes seguidamente se cribaron para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos y derivados de nódulo linfático procedentes de ratones inmunizados con células de heteromieloma no secretoras de la línea K6H6/B5 (ATCC nº CRL 1823). Se sembraron aproximadamente 2×10^5 células en cada placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo.

55 A continuación, se cribaron los pocillos individuales mediante ELISA para anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno (por ejemplo IgG). Tras producirse el crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, habitualmente tras 10 a 14 días. Se sembraron en placa nuevamente los hibridomas secretores de anticuerpos, se cribaron nuevamente, y en el caso de que todavía fuesen positivos para anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno, podían subclonarse por lo menos dos veces mediante dilución limitante. Seguidamente se cultivaron *in vitro* los subclones estables para producir anticuerpos en medio de cultivo de tejidos, para su caracterización.

60 El antígeno puede introducirse en el animal mediante cualquier medio adecuado. Preferentemente, el animal se inmuniza por vía intraesplénica, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea sola o en combinación con agentes inmunomoduladores apropiados (por ejemplo CFA). La dosis de cada antígeno preferentemente debería encontrarse comprendida en el intervalo de entre 1 y 500 pg.

5 Preferentemente, el método de la invención comprende la etapa adicional de proporcionar al animal una dosis de refuerzo de antígeno de entre 1 y 500 pg, 7 a 28 días después de la última inyección. Preferentemente los animales reciben un refuerzo 1 a 5 veces. La inmunización del animal puede llevarse a cabo con o sin portadores farmacéuticos. Son portadores adecuados, por ejemplo, IFA, A13(OH)4 y Abisco

Además, dichos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). La inmunización del animal puede llevarse a cabo con o sin adyuvantes, además de los portadores farmacéuticos.

10 Entre los adyuvantes preferentes para incrementar la efectividad de la composición se incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, CFA, IFA, A13(OH)4 y Abisco.

15 Entre las células productoras de anticuerpos preferentes para la utilización en la invención se incluyen las células B. Estas células productoras de anticuerpos para la utilización en la invención pueden recuperarse mediante la extracción de cualquier componente celular adecuado del sistema inmunológico del animal. Preferentemente se recuperan células productoras de anticuerpos del animal mediante extracción del bazo, nódulos linfáticos, sangre periférica o médula ósea, o partes de los mismos.

20 Descripción de las figuras

Fig. 1 Análisis mediante citometría de flujo de sangre periférica procedente de ratones reconstituidos 15 semanas después de la injertación. Injertación de células hematopoyéticas humanas. Los histogramas muestran la superposición de células sanguíneas periféricas seleccionadas procedentes de tres animales representativos 15 semanas después de la reconstitución, teñidas con mAb anti-CD45 humano-FITC (área sombreada) o con tinción de fondo del mismo animal con mAb irrelevante de control de isotipo correspondiente (línea oscura) que se utilizó como histograma del denominador para generar estadísticos de histogramas superpuestos. Los estadísticos representan el número y porcentaje de sucesos en secciones designadas (M1, M2) en comparación con el número total de sucesos dentro de la clase. Se muestran las intensidades fluorescentes medias.

A:
 30 Histograma del numerador
 Archivo: Probe.002
 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC
 Denominator Histogram
 Archivo: Probe.001
 35 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC

Marcador	Sucesos	% seleccionado
Todos	18110	108,79
M1	16705	100,35
M2	860	5,17

B:
 Histograma del numerador
 40 Archivo: Probe.004
 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC
 Histograma del denominador
 Archivo: Probe.003
 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC

Marcador	Sucesos	% seleccionado
Todos	14622	231,91
M1	11833	187,68
M2	2136	33,88

45 C:
 Histograma del numerador
 Archivo: Probe.006
 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC
 50 Histograma del denominador
 Archivo: Probe.005
 Parámetro X: Anti-hu-CD45-FITC

Marcador	Sucesos	% seleccionado
Todos	4181	95,59
M1	2992	68,40
M2	844	19,30

Figura 2 Examen de la capacidad de producción de anticuerpos humanos en los ratones reconstituidos.

- 5 Figura 3 Análisis de citometría de flujo de anticuerpos específicos de antígenos humanos en sangre periférica de ratones reconstituidos 7 semanas después de la inmunización. Se muestra la proporción (%) de células positivas para antígeno teñidas con diferentes diluciones de suero (1/20 (C) y 1/150 (D)) de un ratón reconstituido e inmunizado en comparación con suero normal de ratón de control (NMS) como control negativo (segundo histograma (B)) o respecto a anticuerpos específicos de antígeno como control positivo (histograma superior (A)).
- 10 Los estadísticos representan el número y porcentaje de sucesos en secciones designadas (los marcadores de M2 y M1 muestran células teñidas positiva o negativamente para el antígeno, respectivamente) en comparación con el número total de la clase. Se muestran las intensidades fluorescentes medias.

A: Control positivo

Histograma del numerador

- 15 Número total de sucesos: 6764

Histograma del denominador

Número total de sucesos: 7072

Marcador	% del total	% seleccionado
Todos	95,54	95,05
M1	2,02	2,01
M2	93,55	93,07

B: NMS de control negativo

Histograma del numerador

Número total de sucesos: 7.093

Histograma del denominador

Número total de sucesos: 7.072

Marcador	% seleccionado	% del total
Todos	100,38	99,87
M1	99,33	98,83
M2	1,08	1,07

C: Suero de ratón 1 (1/20) frente a NMS

Histograma del numerador

Número total de sucesos: 15.544

Histograma del denominador

Número total de sucesos: 7.093

Marcador	% seleccionado	% del total
Todos	160,13	159,45
M1	125,33	124,80
M2	34,84	34,70

D: Suero de ratón 1 (1/150) frente a NMS

Histograma del numerador

Número total de sucesos: 7.102

Histograma del denominador

Número total de sucesos: 7.093

Marcador	% seleccionado	% del total
Todos	100,03	99,61
M1	92,18	91,79
M2	7,86	7,82

Figura 4 Examen de la capacidad de producción de anticuerpos de CXCR5 humanos en los ratones reconstituidos.
Figura 5 Examen de la capacidad de producción de anticuerpos específicos de CXCR5 humanos en los ratones reconstituidos después de la tercera inmunización.

5 Ejemplos

Materiales y métodos

10 Ratones: Se criaron ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} en un fondo de BALB/c y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicas de acuerdo con las directrices de ICH, AAALAC y la directiva EU sobre protección de los animales, 86/609.

15 Ensayo de repoblación de neonatos: El día del nacimiento, se irradiaron ratones neonatos en un intervalo de 3 a 4 horas con 2x2 Gy de una fuente de Cesio 137 (Biobeam 8000, STS GmbH, Braunschweig, Alemania) a razón de 2 Gy/minuto, una dosis que se había titulado como subletal. Transcurridas 4 a 12 horas de la irradiación, los ratones recibieron trasplantes de, por ejemplo, células FL CD133⁺ solas o en combinación con células hepáticas CD133⁻ no hematopoyéticas en 25 µl de PBS o en combinación con factores de crecimiento en el hígado (i.h.) utilizando una aguja de calibre 30 (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza). Los neonatos en todos los casos recibieron células procedentes de donantes individuales. Los ratones se destetaron a las 3 semanas de edad. Análisis de los ratones: para obtener células de sangre periférica y plasma, los ratones se sangraron por el seno venoso retroorbital bajo anestesia con éter.

25 Análisis de citometría de flujo y separación celular. Para el análisis de FACS y la separación celular, se utilizaron anticuerpos monoclonales, biotinilados o conjugados con FITC, PE o APC contra los antígenos siguientes: CD3 (UCHT1), CD4 (13B8.2), CD8(B9.11), CD40 (MAB89), CD80 (MAB104), CD83 (HB15a), CD86 (HA5.2B7) (todos de Immunotech/Beckman Coulter, Marseille, Francia), CD19 (HIB19), CD20 (2H7), CD34(581), IL-3Ra/CD123 (9F5), CD11c (B-ly6) CD14 (M5E2) (todos de BD Pharmingen, SanDiego, CA), CD45 (HI30), CD45RA (MEM56), HLA-DR (TU36) (todos de Caltag, Burlingame, CA), TLR2 (TL2.1), TLRR4 (HTA125), TCRab (IP26), (todos de Bioscience, San Diego, CA), BDCA-1, BDCA-2, BDCA-4, CD25 (4E3) (todos de Miltenyi Biotec), IgM (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA), CCR7 (3D12, proporcionado por M. Lipp, Berlin, Alemania). Se utilizó el IOTest Beta Mark para el análisis de VB (Immunotech/Beckman Coulter). Se utilizó FITC conjugada con estreptavidina, PE o APC (todos de BD Pharmingen) para la visualización de los anticuerpos biotinilados. Se excluyeron las células muertas mediante tinción con yoduro de propidio. Se utilizaron mAbs irrelevantes de control de isotipo correspondiente para determinar el nivel de la tinción de fondo. Las células se analizaron utilizando un FACScalibur y se separaron utilizando un FACSVantage SE (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA).

Células de hígado fetal. Fuentes de células de hígado fetal: Cambrex Corp. USA y StemCell Technologies Corp. USA.

40 Ejemplo 1

Procedimiento de inmunización de ratones reconstituidos

45 Se inmunizaron tres ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} (3 hembras) con 100 µg de plásmido de ADN codificante de la proteína HER3 humana. En total hasta se proporcionaron seis inmunización por vía intramuscular (i.m.). Tras observar que los títulos séricos de anti-HER3 eran suficientes, los ratones recibieron un refuerzo adicional en tres ocasiones con 30 µg de proteína HER3 purificada en 100 µl de PBS por vía intravenosa (i.v.) 3, 2 y 1 día antes de la fusión.

50 Ejemplo 2

Análisis de citometría de flujo de sangre periférica procedente de ratones reconstituidos 15 semanas después de la injertación.

55 Los ratones se anestesiaron con isoflurano y después se recogió sangre periférica del plexo venoso orbital para medir la proporción positiva de hemocitos humanos mediante la utilización de citometría de flujo. La sangre recogida

5 se mezcló bien instantáneamente con EDTA-2Na y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el análisis. Se añadió una cantidad óptima de anticuerpos anti-CD45 humano conjugados con FITC y se hicieron reaccionar con 50 μ l de sangre completa a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se llevó a cabo la hemólisis y la inmovilización utilizando solución de FACS y se midió la proporción utilizando un FACScalibur. La fig. 1 muestra la proporción (%) de células humanas positivas para CD45 en sangre periférica de los tres ratones sometidos a ensayo.

Ejemplo 3

10 Examen de la capacidad de producción de anticuerpos humanos de HER3 en los ratones reconstituidos.

15 Se midió mediante ELISA la cantidad de IgG humana total en sangre periférica de ratones reconstituidos. Se recubrió una placa de 96 pocillos MaxiSorb (NUNC) con suero de ratón diluido y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo con solución de proteína C al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y después se añadieron anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Tras una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y se añadió solución de sustrato ABTS en una reacción de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la absorbancia se midió a 405 nm (fig. 2). Se calculó la concentración de IgG de acuerdo con la curva estándar.

20 Ejemplo 4

Análisis de citometría de flujo de anticuerpos humanos de HER3 en sangre periférica de ratones reconstituidos 7 semanas después de la inmunización.

25 Transcurridas 17 semanas de la reconstitución, los ratones fueron inmunizados con proteína humana de interés. La inmunización se llevó a cabo por vía intramuscular con 25 a 100 μ g/ratón de ADN codificante de una proteína humana de interés conjuntamente con cóctel de citoquinas como adyuvante para potenciar la respuesta inmunológica. Se llevó a cabo la misma inmunización cada cuatro semanas y se extrajo suero para medir los anticuerpos específicos de proteína humana mediante FACS. Brevemente, se añadió antisero diluido a las células que expresaban proteína humana y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió una cantidad óptima de anticuerpos antihumanos conjugados con FITC y se hicieron reaccionar con células durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se midió la proporción positiva de células que expresaban proteína humana teñidas utilizando el FACScalibur. La fig. 3 muestra la proporción (%) de células positivas para proteína humana teñidas con diferentes diluciones séricas (1/20 y 1/150) de ratones reconstituidos e inmunizados en comparación con suero de ratón normal (NMS) como control negativo, o con anticuerpos purificados específicos de proteína humana como control positivo.

Ejemplo 5

40 Selección positiva de células CD19⁺ utilizando Dynabeads[®]

Se aislaron directamente células B CD19⁺ a partir de sangre periférica o de suspensiones de esplenocitos siguiendo protocolos estándares de DYNAL para Dynabeads[®] CD 19 (Pan B) (número de producto 111.03/111.04) y DETACHaBEAD[®] CD19 (nº de prod. 125.06):

- 45
- Adición de 25 μ l de Dynabeads[®] a, por ejemplo, $2,5 \times 10^7$ células preparadas
 - Incubación durante 20 minutos a una temperatura de entre 2°C y 8°C bajo balanceo y rotación suaves
 - Introducción del tubo en un imán durante 2 minutos.
 - Descartado del sobrenadante y lavado suave de las células unidas a perlas 4 veces, utilizando el
- 50 procedimiento siguiente:
- Adición de 1 ml de tampón 1 por cada 1×10^7 Dynabeads[®]
 - Introducción del tubo en el imán durante 1 minuto y descartado del sobrenadante
 - Resuspensión de las células en tampón/medio para la aplicación posterior

55 Ejemplo 6

Electrofusión para la generación de hibridoma

60 Se realizó un recuento de las células CD19⁺ aisladas y se fusionaron utilizando protocolos de electrofusión (Eppendorf applications for Electrofusion No.58).

- Recolección tanto de células CD19⁺ aisladas como de parejas de fusión, por ejemplo K6H6/B5, mediante

- centrifugación (200xg, 10 minutos a temperatura ambiente),
 - Resuspensión de pellets en medio de crecimiento y determinación del número de células,
 - Fijación del número de células de cada pareja de fusión en, por ejemplo, 3x10⁵ por fusión,
 - Pipeteado de ambas parejas conjuntamente y centrifugación a 200xg durante 10 minutos a temperatura ambiente,
 - Lavado del pellet dos veces en tampón de electrofusión, centrifugación tal como se ha indicado anteriormente,
 - Resuspensión del pellet en 200 µl de tampón de electrofusión por cada fusión,
 - Rellenado de la cámara de fusión y fusión inmediata (ver el protocolo de aplicación del aparato de fusión, Eppendorf),
 - Tras la fusión, se dejan reposar las cámaras durante 10 minutos a temperatura ambiente,
 - Enjuague de la cámara con medio y transferencia de células fusionadas a las placas de clonación,
 - Adición de medio de selección HAT tras una incubación de 24 horas (5% de CO₂, 37°C),
 - Tras 7 a 21 días de incubación, se realizó un recuento y se analizaron los híbridos.
- 15 Se analizaron los hibridomas humanos cultivados (40 clones) 14 días tras la fusión para IgG específicas para proteínas totales y humanas en ELISAs establecidas y se detectaron por lo menos 6 clones como positivos.

Hibridoma	Conc. de HER3 según ELISA (pg/ml)	Conc. de IgG según ELISA (pg/ml)	Conc. de IgF según ELISA (pg/ml)
G2:1	0,006	0,015	<0
G3:1	0,165	0,017	<0
C4:1	<-0,001	0,015	<0
E9:1	0,001	0,010	<0
G9:1	0,002	0,020	<0
C10:1	0,055	0,014	<-0,001

Ejemplo 7

20 Procedimiento de inmunización de ratones reconstituidos

Se inmunizaron tres ratones Rag2^{-/-}γc^{-/-} (4 hembras) con 100 pg de plásmido de ADN codificante de la proteína CXCR5 humana. En total hasta se proporcionaron seis inmunización por vía intramuscular (i.m.).

25 Administración de refuerzo en los ratones

Tras observar que los títulos séricos de anti-CXCR5 eran suficientes, los ratones recibieron un refuerzo adicional en tres ocasiones de 5x10⁶ células que expresan CXCR5 en 100 µl de PBS por vía intravenosa (i.v.) 3, 2 y 1 día antes de la fusión.

Ejemplo 8

35 Examen de la capacidad de producción de anticuerpos humanos de CXCR5 en los ratones reconstituidos.

Se midió mediante ELISA la cantidad de IgG humana total en sangre periférica de ratones reconstituidos. Se recubrió una placa de 96 pocillos MaxiSorb (NUNC) con suero de ratón diluido y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo con solución de proteína C al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y después se añadieron anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Tras una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y se añadió solución de sustrato ABTS en una reacción de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la absorbancia se midió a 405 nm (fig. 4). Se calculó la concentración de IgG de acuerdo con la curva estándar (250 pg/ml de IgG humana total).

Ejemplo 9

Análisis de anticuerpos de CXCR5 humanos en ratones reconstituidos tras la tercera inmunización.

Se midió la cantidad de IgG específica de CXCR5 humana en suero de ratones reconstituidos mediante ELISA

5 específica de CXCR5 (fig. 5). Se recubrió una placa de 96 pocillos MaxiSorb (NUNC) con suero de ratón diluido y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo con solución de proteína C al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y después se añadieron anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Tras una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado y se añadió solución de sustrato ABTS en una reacción de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia a 405 nm.

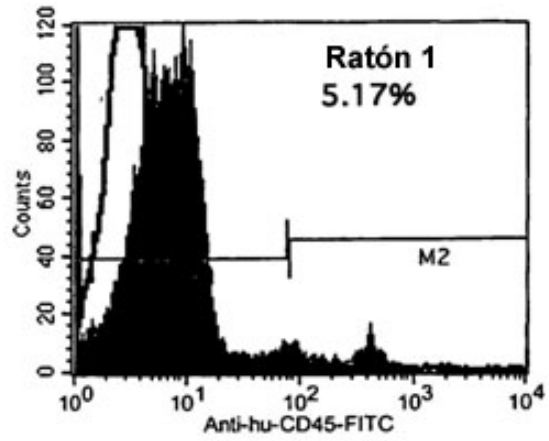
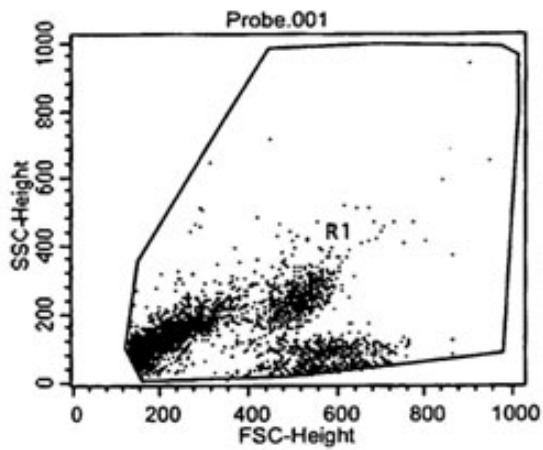
Reivindicaciones

- 5 1. Método para la producción de un anticuerpo monoclonal humano de un animal no humano inmunodeficiente, comprendiendo dicho método poner en contacto un animal no humano inmunodeficiente neonato con una célula madre de hígado fetal humano para generar un animal no humano transplantado inmune (animal reconstituido), poner en contacto seguidamente dicho animal reconstituido con un antígeno, recoger a partir de dicho animal reconstituido células humanas productoras de anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislar dicho anticuerpo respecto de dichas células productoras de anticuerpos. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho animal no humano inmunorreconstituido es un roedor.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicho animal no humano reconstituido es un ratón o una rata.
3. Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho ratón reconstituido es un ratón Rag2^{-/-}γc^{-/-}, Rag2^{-/-} desnudo, NOD o SCID beige.
- 15 4. Método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dichas células madre de hígado fetal son células madre hematopoyéticas de hígado fetal humano.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichas células madre de hígado fetal es una combinación de células madre hematopoyéticas de hígado fetal humano y células madre no hematopoyéticas de hígado fetal humano.
- 20 6. Método según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichas células productoras de anticuerpos son células B humanas.
7. Método según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el antígeno es un polipéptido.
- 25 8. Método según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el antígeno se pone en contacto con el animal reconstituido como antígeno, fragmento de antígeno, complejo de MHC/péptido, ADN codificante de antígeno y/o célula portadora de antígeno.
- 30 9. Método según las reivindicaciones 1 ó 9, caracterizado porque el animal no humano reconstituido se irradia subletalmente antes de ponerse en contacto con las células madre de hígado fetal humano.
10. Método según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el ratón se pone en contacto en primer lugar con el antígeno 5 a 18 semanas después de poner en contacto dicho ratón con dichas células madres de hígado fetal humano.
- 35 11. Método según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el ratón se pone en contacto hasta diez veces con el antígeno.
12. Método según las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque dichas células recogidas son células humanas CD19⁺ o CD22⁺.
- 40 13. Método según las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dichas células se establecen mediante tecnología del hibridoma.
14. Método según las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la línea celular de pareja de fusión es una línea celular MFP-2, HK-128, K6H6/B5 ó Karpas 707.
- 45 15. Método para la producción de una pluralidad de células B humanas productoras de una pluralidad de anticuerpos humanos contra un antígeno, estando caracterizado dicho método por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con células madre de hígado fetal humano, para generar un animal inmunorreconstituido, poniendo en contacto seguidamente dicho animal reconstituido con un antígeno, recogiendo dicha pluralidad de células B humanas productoras de anticuerpos a partir de dicho animal no humano.
- 50 16. Método para la producción recombinante de un anticuerpo, caracterizado por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con células madre de hígado fetal humano, seguidamente poniendo en contacto dicho animal no humano con un antígeno, recogiendo a partir de dicho animal no humano unas células humanas productoras de anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislando dicho anticuerpo, secuenciando las regiones variables, construyendo uno o más vectores de expresión codificantes de por lo menos las CDRs de las cadenas pesadas y/o ligeras, en combinación con una cadena constante humana,
- 55

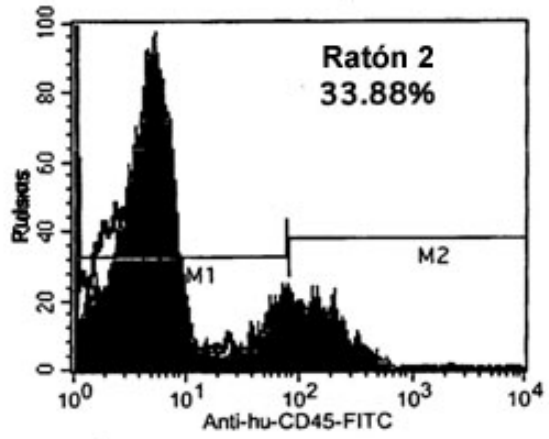
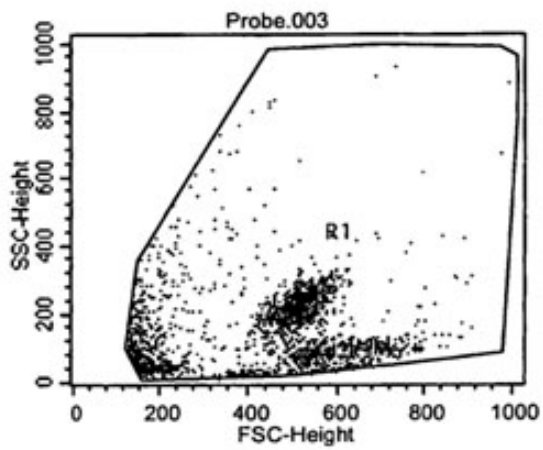
expresando dicho vector o vectores en una o más células huésped apropiadas, y aislando dicho anticuerpo (proteína inmunorreactiva) de dicha célula o células huésped o sobrenadante de fermentación.

- 5
- 10
17. Método para la producción recombinante de un anticuerpo, caracterizado por la puesta en contacto de un animal no humano inmunodeficiente neonato con unas células madre de hígado fetal humano, seguidamente poniendo en contacto dicho animal no humano con un antígeno, recogiendo a partir de dicho animal no humano unas células humanas que producen anticuerpos humanos contra dicho antígeno, y aislando ARNm de dichas células humanas productoras de anticuerpos humanos, generando ADNc específico de anticuerpo (por ejemplo mediante la utilización de cebadores específicos de inmunoglobulina), construyendo uno o más vectores de expresión codificantes de por lo menos las CDRs de las cadenas pesadas y/o ligeras, en combinación con una cadena constante humana, expresando dicho vector o vectores en una o más células huésped apropiadas, y aislando dicho anticuerpo (proteína inmunorreactiva) de dicha célula o células huésped o sobrenadante de fermentación.

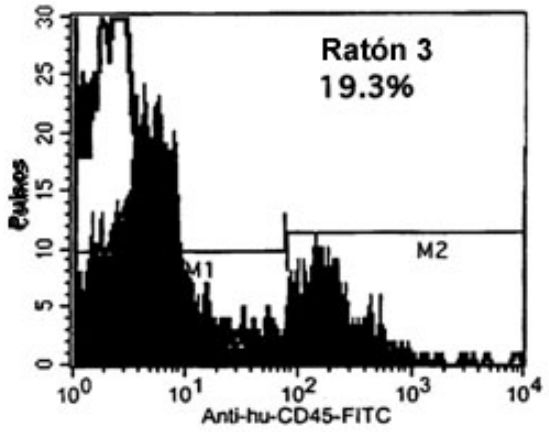
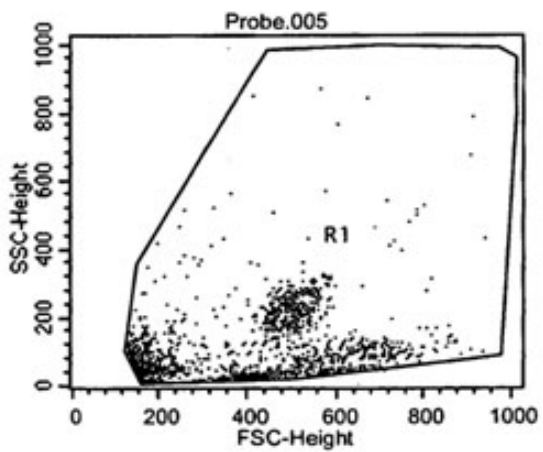
Fig. 1



A



B



C

Fig. 2

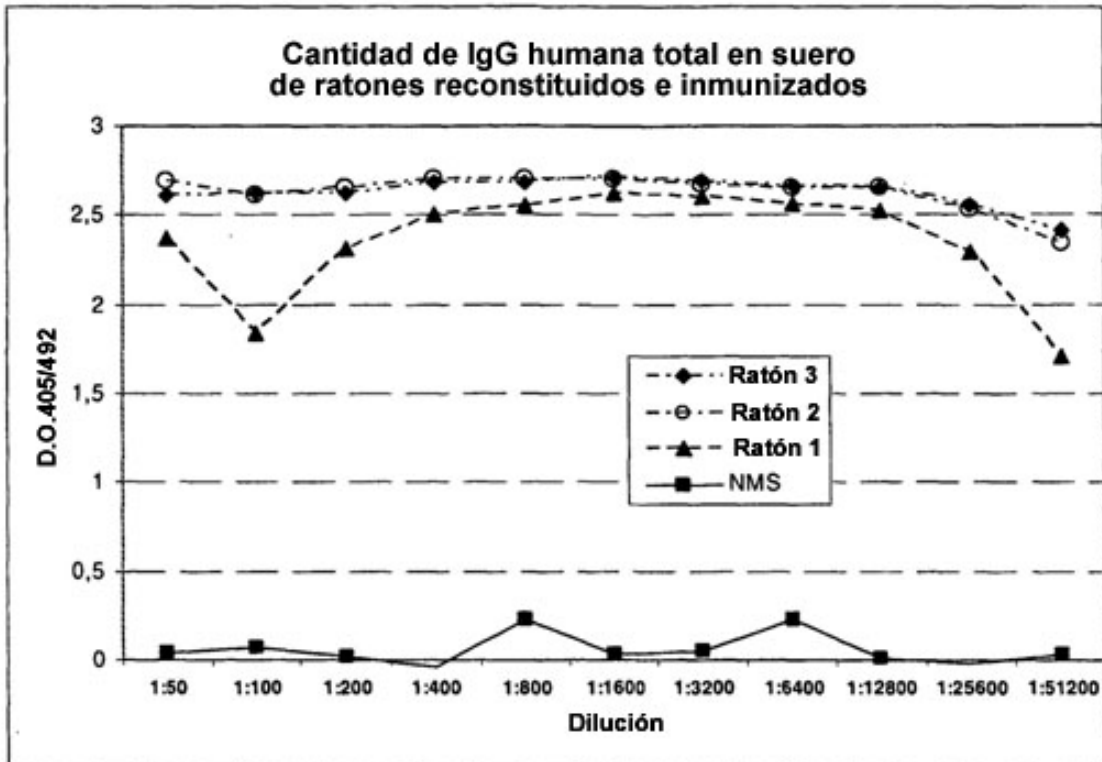
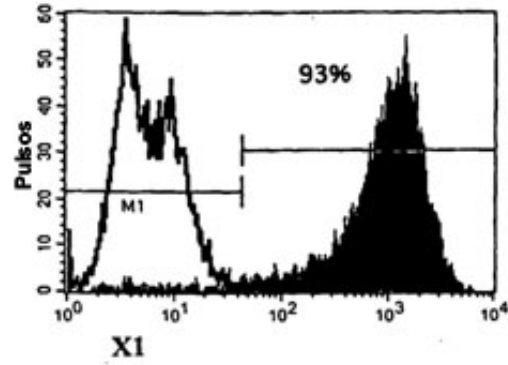
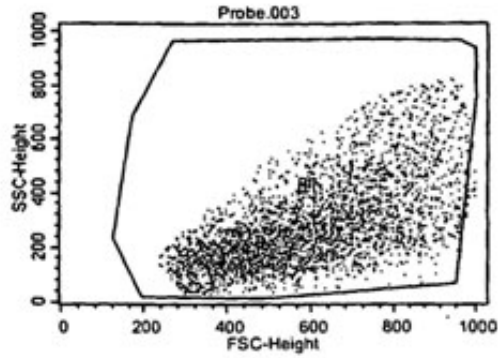
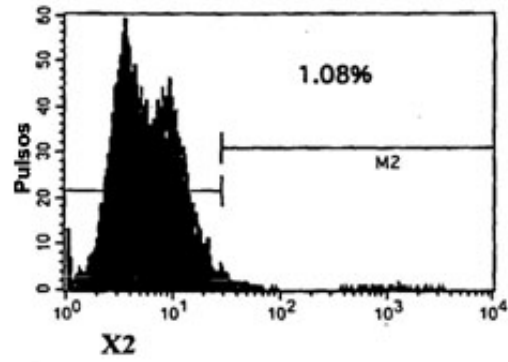


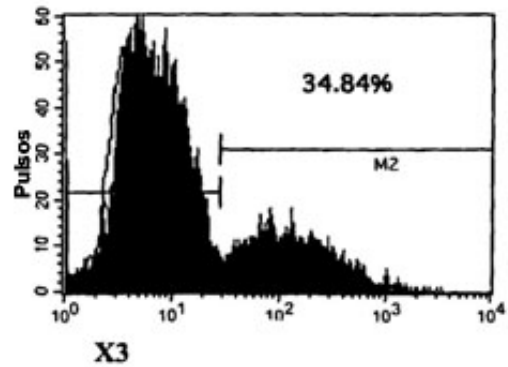
Fig. 3



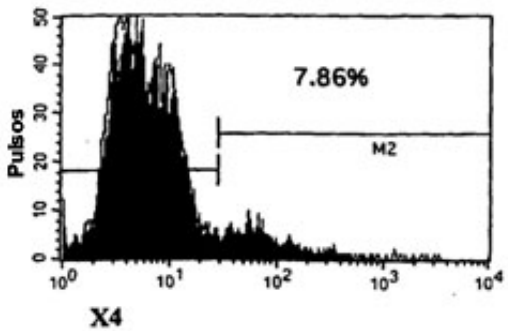
A



B



C



D

X1 sin ab/a-hu-IgGAlexa488
 X2 NMS 1/50/a-hu-IgGAlexa488
 X3 1/a-hu-IgGAlexa488 de suero de ratón
 X4 1/a-hu-IgGAlexa488 de suero de ratón

a-hu-IgGAlexa488=IgG anti-humana marcada con Alexa488

Fig. 4

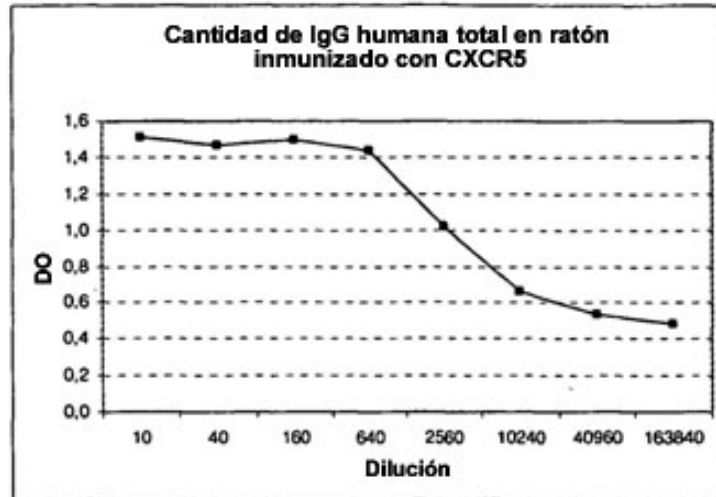


Fig. 5

