



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 652**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03773780 .6**

96 Fecha de presentación : **15.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1537419**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Procedimiento de evaluación de la eficacia ADCC mediada por el CD16 de anticuerpos monoclonales o policlonales.**

30 Prioridad: **13.09.2002 FR 02 11415**
13.09.2002 FR 02 11416

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.07.2011

73 Titular/es: **LFB Biotechnologies**
3 avenue des Tropiques Z.A. de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR

72 Inventor/es: **De Romeuf, Christophe;**
Gaucher, Christine;
Glacet, Arnaud;
Dhainaut, Frédéric;
Bourel, Dominique;
Bihoreau, Nicolas y
Nony, Emmanuel

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de evaluación de la eficacia ADCC mediada por el CD16 de anticuerpos monoclonales o policlonales.

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para medir la activación de una célula efectora, que pertenece al sistema inmunitario o modificada *in vitro* mediante un anticuerpo monoclonal (AcMo) o policlonal, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia del anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo y una medición de la calidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16. La solicitud se refiere asimismo a la selección de anticuerpos que presentan la característica de inducir la expresión de citoquinas y de interleucinas, en particular el IFN γ o la IL2.

La inmunoterapia con la ayuda de anticuerpos policlonales o monoclonales está a punto de convertirse en uno de los aspectos más importantes de la medicina. Por el contrario, los resultados obtenidos durante los ensayos clínicos aparecen contrastados. En efecto, puede resultar que el anticuerpo monoclonal no sea suficientemente eficaz. En la actualidad, las investigaciones se orientan al fragmento Fc γ de la inmunoglobulina con el fin de mejorar las propiedades de los anticuerpos. En el futuro, esto debería permitir la obtención de anticuerpos que interactúan y que activan los receptores de las células efectoras (macrófago, linfocito T y NK).

La actividad biológica de ciertas inmunoglobulinas G es dependiente de la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula, y en particular en su parte Fc. Las moléculas IgG de todas las sub-clases humanas y murinas poseen un N-oligosacárido fijado al dominio CH₂ de cada cadena pesada (en el residuo Asn 297 para las IgG humanas). Se ha demostrado la influencia de este residuo glicánico sobre la capacidad del anticuerpo para interactuar con unas moléculas efectoras (Fc receptores y complemento). La inhibición de glicosilación de una IgG1 humana, mediante el cultivo en presencia de Tunicamicina, provoca por ejemplo una disminución de 50 veces de la afinidad de este anticuerpo para el receptor Fc γ RI presente sobre los monocitos y macrófagos (Leatherbarrow *et al.*, 1985). La fijación al receptor Fc γ RIII está afectada asimismo por la pérdida de carbohidratos sobre la IgG, puesto que se ha descrito que una IgG3 no glicosilada es capaz de inducir una lisis de tipo ADCC por medio del receptor Fc γ RIII de las células NK (Lund *et al.*, 1990).

Sin embargo, más allá de la presencia necesaria de estos residuos glicánicos, es más precisamente la heterogeneidad de su estructura lo que puede ocasionar unas diferencias en la capacidad para activar unas funciones efectoras. Se han observado unos perfiles de galactosilación variables en función de los individuos (IgG1 humanas séricas). Estas diferencias reflejan probablemente unas disparidades en la actividad de las galactosiltransferasas y otras enzimas entre los clones celulares de estos individuos (Jefferis *et al.*, 1990). Mientras que esta heterogeneidad normal de los procesos post-traduccionales genera diferentes glicoformas (incluso en el caso de anticuerpos monoclonales), puede conducir a unas estructuras atípicas asociadas a ciertos estados patológicos tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, para los cuales se ha demostrado una proporción importante de los residuos agalactosilados (Parekh *et al.*, 1985).

Frente a la complejidad planteada por la relación existente entre las diferentes estructuras glicánicas y la actividad de los anticuerpos, sería útil poder discriminar rápidamente cuáles son los anticuerpos eficaces y permitir así seleccionar unas líneas celulares que producen unos anticuerpos que tienen una mejor eficacia o unas propiedades específicas en la activación o en la inhibición de ciertos componentes del sistema inmunitario.

En la solicitud FR 0004685 del 12 de abril de 2000 (LFB), se describió un nuevo procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal capaz de activar las células efectoras que expresan el Fc γ RIII. En este procedimiento, se ensayan unos anticuerpos monoclonales que proceden de hibridomas o de líneas transfectadas en una mezcla de reacción que comprende las células diana de dichos anticuerpos, unas células efectoras que comprenden unas células que expresan el Fc γ RIII y unas IgG polivalentes. Así, se puede determinar el porcentaje de lisis de las células diana y seleccionar unos anticuerpos monoclonales que activan las células efectoras que provocan una lisis significativa de las células diana (actividad ADCC de tipo Fc γ RIII). Por ejemplo, la parte Fab del anticuerpo anti-D se fijará sobre el antígeno Rhesus D contenido por los hematíes. A consecuencia de esta fijación, su parte Fc se fija entonces sobre el receptor Fc gamma RIII o CD16 de la célula efectora (célula NK). Este "sándwich" induce la secreción de sustancias químicas de tipo perforinas que lisarán el glóbulo rojo. Se trata por lo tanto de una citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (CCDA) o ADCC en inglés. Para acercarse de las condiciones fisiológicas, el ensayo se efectúa en presencia de inmunoglobulinas polivalentes humanas.

En el marco de la invención, se ha descubierto que la fijación de un anticuerpo sobre su ligando puede inducir una activación de la célula Jurkat transfectada CD16 que induce la secreción de IL2. Se observa una fuerte correlación entre la secreción de IL2 por Jurkat CD16 y la actividad ADCC mediada por el CD16 de las células efectoras. Además, se ha observado que un mismo anticuerpo dirigido contra un antígeno dado es completamente ineficaz cuando está producido en unas líneas de mieloma de ratón, mientras que se muestra muy eficaz cuando está producido en otras líneas celulares.

El problema es por lo tanto saber cuál es la capacidad de un anticuerpo dado para estimular la producción de citoquinas por las células efectoras y cuáles son las consecuencias de dicha activación en función de la naturaleza de las citoquinas liberadas.

- 5 La solicitud propone por lo tanto la utilización de anticuerpos seleccionados por un ensayo Jurkat CD16 mediante la medición de IL2 segregada o de otras citoquinas, lo cual permite garantizar la actividad biológica de dichos anticuerpos para un uso terapéutico.

Descripción

- 10 La invención es tal como se describe en las reivindicaciones.

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para medir la activación de una célula efectora que pertenece al sistema inmunitario, transformada o no, por un anticuerpo monoclonal (AcMo) o policlonal, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia del anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

Mediante la expresión "célula transformada" se entiende una célula modificada genéticamente, de manera que exprese un receptor, en particular el receptor CD16.

De manera más general, se utiliza para la selección de los anticuerpos una línea de tipo Jurkat u otra línea transfectada con un vector de expresión que codifica para un receptor Fc, incluyendo CD16, CD32 y CD64, como célula efectora. Preferentemente, se utiliza una línea Jurkat transfectada con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16 como célula efectora. Esta línea es particularmente ventajosa puesto que es inmortalizada y se desarrolla indefinidamente en unos medios de cultivo.

Entre las citoquinas que se pueden cuantificar, es posible medir la producción de por lo menos una citoquina seleccionada de entre IL1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, etc. TNF α , TGF β , IP10 e IFN γ . Se puede seleccionar ventajosamente la interleucina IL-2.

El porcentaje de citoquina producida es un marcador de activación o de inhibición de las células efectoras.

Preferentemente, el porcentaje de interleucina IL2 segregada refleja la calidad del anticuerpo fijado por el receptor CD16 en cuanto a su integridad (función Fc) y a su eficacia (sitio antigénico) de unión al antígeno. La medición del porcentaje de IL2 está correlacionada con una actividad de tipo ADCC.

En otro aspecto, la solicitud se refiere a un procedimiento para evaluar la eficacia de un anticuerpo monoclonal o policlonal, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células efectoras del sistema inmunitario, transformadas o no, que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia de un anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

Este procedimiento está particularmente adaptado para evaluar la eficacia de un anticuerpo monoclonal o policlonal de especificidad anti-Rh D del glóbulo rojo humano.

En otro aspecto, la solicitud se refiere a un procedimiento para evaluar la capacidad de una célula para producir un anticuerpo monoclonal eficaz, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células efectoras del sistema inmunitario, transformadas o no, que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia de un anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

Este procedimiento se puede llevar a cabo para unas células utilizadas para la producción de anticuerpos terapéuticos, tales como CHO, YB2/0, unas células linfoblastoides humanas, unas células de insectos y unas células de mielomas murinos.

Este procedimiento puede ser aplicado asimismo a la evaluación de la producción de AcMo por unas plantas transgénicas o de mamíferos transgénicos.

En un aspecto complementario, la solicitud se refiere a un procedimiento para evaluar la eficacia y la integridad de anticuerpos policlonales después de una etapa o de varias etapas de purificación, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células efectoras del sistema inmunitario, transformadas o no, que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia del anticuerpo purificado y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

Los procedimientos descritos anteriormente se pueden llevar a cabo eventualmente en presencia de

inmunoglobulinas humanas (IVIg).

A título de ejemplo, se seleccionarán los anticuerpos para los cuales se observa un aumento superior a 100%, 250%, 500% o 1.000% del porcentaje de liberación de IL-2 con respecto al control en ausencia de anticuerpos o un anticuerpo dado como referencia negativa.

La solicitud se refiere asimismo a la utilización del procedimiento descrito anteriormente para seleccionar unos anticuerpos eficaces para un tratamiento terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo seleccionado puede ser un anti-D. Puede estar destinado asimismo al tratamiento de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias, de los cánceres y de las infecciones por unos agentes patógenos.

La solicitud se refiere asimismo a un kit que permite evaluar la actividad biológica de un anticuerpo que comprende unos medios y unos agentes reactivos necesarios, y unas células efectoras que expresan el receptor CD16 para la realización del procedimiento descrito anteriormente que permite la dosificación de por lo menos una citoquina, en particular IL-2, IFN y TNF.

Además, este ensayo puede comprender asimismo un ensayo ADCC. A este respecto, la solicitud se refiere a un procedimiento de selección de un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano optimizado, caracterizado porque comprende una puesta en contacto de células que expresan el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia del anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

En un modo de realización particular, el anticuerpo de la solicitud es capaz de inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula leucocitaria, en particular de la familia de las NK (natural killer) o por unas células del grupo monocitos-macrófagos. De manera general, se utiliza para la selección de los anticuerpos una línea de tipo Jurkat u otra línea transfectada con un vector de expresión que codifica para un receptor Fc, incluyendo CD16, CD32 y CD64, como célula efectora. Preferentemente, se utiliza para la selección de los anticuerpos una línea Jurkat transfectada con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16 como célula efectora. Esta línea es particularmente ventajosa puesto que es inmortalizada y se desarrolla indefinidamente en unos medios de cultivos. El porcentaje de interleucina IL2 segregado refleja la calidad del anticuerpo fijado por el receptor CD16 en cuanto a su integridad (función Fc) y a su eficacia (sitio antigénico) de unión al antígeno.

En otro modo de realización, el anticuerpo optimizado se puede preparar después de haber sido purificado y/o modificado *ex vivo* mediante modificación de la estructura glicánica del fragmento Fc. Con este fin, se puede utilizar cualquier medio químico, cromatográfico o enzimático apropiado para modificar la estructura glicánica de los anticuerpos.

En otro modo de realización, el anticuerpo se puede producir mediante unas células de líneas de mieloma de rata, en particular YB2/0 y sus derivados. Se pueden seleccionar otras líneas por sus propiedades para producir los anticuerpos definidos anteriormente. Se podrán ensayar por ejemplo unas células linfoblastoides humanas, unas células de insectos y unas células de mieloma murino. La selección se puede aplicar asimismo a la evaluación de los anticuerpos producidos por unas plantas transgénicas o de mamíferos transgénicos. Con este fin, la producción en CHO sirve de referencia (siendo CHO utilizado para la producción de anticuerpos medicamento) para comparar y seleccionar los sistemas de producción que conducen a los anticuerpos según la solicitud.

La estructura glicánica general del anticuerpo es de tipo biantenada, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de enganche terminales no intercalares, y una baja fucosilación. En estos anticuerpos, el porcentaje de GlcNAc intermedio es no nulo. Por ejemplo, se pueden utilizar unas composiciones de anticuerpos que presentan un contenido superior a 60%, preferentemente superior a 80% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, entendiéndose que las formas G0F + G1F son inferiores a 50%, preferentemente inferiores a 30%. Estas composiciones se pueden obtener con unas líneas de mielomas de rata, por ejemplo con la línea YB2/0.

En un segundo aspecto, la solicitud se refiere a la utilización de un anticuerpo descrito anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula efectora que pertenece al sistema inmunitario, estando dicho anticuerpo caracterizado porque es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento de selección que comprende una puesta en contacto de células efectoras del sistema inmunitario que expresan el receptor CD16, transformadas o no, en un medio de reacción en presencia del anticuerpo a ensayar y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de por lo menos una citoquina producida por la célula que expresa el receptor CD16.

Preferentemente, se utiliza para la selección de los anticuerpos una línea Jurkat transfectada con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16 como célula efectora. Dichas citoquinas liberadas son unas interleucinas, unos interferones y unos factores de necrosis tisular (TNF). Así, el anticuerpo seleccionado tiene la capacidad de inducir la secreción de por lo menos una citoquina seleccionada de entre IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, etc. TNF α , TGF β , IP10 e IFN γ por las células efectoras del sistema inmunitario que expresa el receptor CD16.

Preferentemente, el anticuerpo seleccionado tiene la capacidad de inducir la secreción de IL-2 por las células efectoras del sistema inmunitario que expresan el receptor CD16. El porcentaje de interleucina IL2 segregada refleja la calidad del anticuerpo fijado por el receptor CD16 en cuanto a su integridad (función Fc) y a su eficacia (sitio antigénico) de unión al antígeno. La medición del porcentaje de IL2 está correlacionada con una actividad de tipo ADCC.

La selección se puede realizar sobre unos anticuerpos producidos por unas células utilizadas habitualmente para la producción de anticuerpos terapéuticos, tales como CHO, YB2/0, las células linfoblastoides humanas, las células de insectos y las células de mielomas murinos. La selección se puede aplicar asimismo a la evaluación de anticuerpos producidos por unas plantas transgénicas o de mamíferos transgénicos.

Preferentemente, la solicitud se refiere a la utilización de un anticuerpo producido por una línea de mieloma de rata, por ejemplo con la línea YB2/0 para la preparación de un medicamento destinado a inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula efectora que pertenece al sistema inmunitario. A este respecto, la solicitud se refiere a la utilización de un anticuerpo que presenta una estructura glicánica de tipo biantenada, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de enganche terminales no intercalares, y una baja fucosilación para la preparación de un medicamento destinado a inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula efectora que pertenece al sistema inmunitario. En este anticuerpo, el porcentaje de GlcNAc intermedio es no nulo. Por ejemplo, se pueden utilizar unas composiciones de anticuerpos que presentan un contenido superior a 60%, preferentemente superior a 80% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, entendiéndose que las formas G0F + G1F son inferiores a 50%, preferentemente inferiores a 30%.

En un modo de realización particular, el anticuerpo seleccionado es capaz de inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula leucocitaria, en particular de la familia de las NK (natural killer) o por unas células del grupo monocitos-macrófagos.

La solicitud se refiere asimismo a la utilización de los anticuerpos seleccionados descritos anteriormente específicos de un antígeno que proceden de una célula patológica o de un organismo patógeno para el ser humano.

Este anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal de especificidad anti-Rhesus del glóbulo rojo humano.

El anticuerpo según la solicitud puede asimismo ser un anticuerpo dirigido contra unos virus patógenos para el ser humano, contra unos antígenos de tumores malignos o contra los antígenos de una bacteria o de un parásito patógeno para el ser humano.

Ventajosamente, el anticuerpo seleccionado muestra un aumento superior a 100%, 250%, 500% o 1.000% del porcentaje de liberación de IL-2 con respecto al control en ausencia de anticuerpos o en presencia de un anticuerpo dado como referencia negativa.

Los procedimientos descritos anteriormente se pueden llevar a cabo eventualmente en presencia de inmunoglobulinas humanas (IVIg). Para la comparación, se pueden utilizar unos anticuerpos homólogos producidos en CHO, o también unos anticuerpos de referencia disponibles en el comercio.

En un aspecto suplementario, la solicitud prevé la utilización de dichos anticuerpos seleccionados como soporte terapéutico en medicina humana, en particular para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades autoinmunes, inflamatorias, de los cánceres y de las infecciones por unos agentes patógenos.

Leyenda

Figura 1: Descripción del ensayo ADCC CMN.

Las células mononucleadas en presencia de Tegelina (IVIg) son incubadas con los anticuerpos anti-Rhesus D y unos hematíes Rhesus + (diana). Después de una noche a 37°C, se mide la lisis de los hematíes mediante la evaluación del porcentaje de hemoglobina liberada en el medio de reacción.

Figura 2: Descripción del ensayo ADCC NK

Las células NK purificadas son incubadas con los anticuerpos anti-Rhesus D y unos hematíes Rhesus + (diana). Después de una noche a 37°C, se mide la lisis de los hematíes mediante evaluación del porcentaje de hemoglobina liberada en el medio de reacción.

Figura 3: Resultados ADCC NK e inhibición por el anti-CD16 "3G8".

Los anticuerpos anti-D, DF5-EBV (expresado por la célula B inmortalizada EBV), DF5-YB2/0 (expresado por la célula YB2/0), son comparados con el anticuerpo policlonal WinRho para su capacidad a inducir la lisis de hematíes Rhesus D en presencia de células NK. La inhibición de ADCC se estudia en presencia del anti-CD16 3G8.

Figura 4: Descripción del ensayo Jurkat CD16.

Unas células Jurkat CD16 se mezclan con diferentes anticuerpos anti-D en presencia de hematíes Rhesus+ y de PMA. Después de una noche de incubación, la liberación de IL-2 en el sobrenadante se cuantifica mediante ELISA.

Figura 5: Resultados del ensayo Jurkat CD16.

Comentarios: los anticuerpos positivos en ADCC-NK inducen una secreción de IL-2 en presencia de Jurkat CD16 y de su diana.

Figura 6: Liberación de citoquina (IL-1, IFN y TNF) por unos leucocitos activados por unos anticuerpos en presencia de su diana.

A- Esquema de activación de los leucocitos.

B- Los leucocitos han sido incubados con diferentes anticuerpos en presencia de hematíes. Después de una noche de incubación, la liberación de TNF α e IFN γ en el sobrenadante ha sido cuantificada mediante ELISA.

Figura 7: Liberación de citoquina (IFN, TNF) por unas células NK activadas por unos anticuerpos en presencia de su diana (LFB-R297-RBC).

A- Esquema de activación de las células NK.

B- Unas células NK purificadas han sido mezcladas con diferentes anticuerpos anti-D en presencia de hematíes Rhesus+. Después de una noche de incubación, la liberación de TNF α y de IFN γ en el sobrenadante ha sido cuantificada mediante ELISA.

Figura 8: Liberación de IL2 por Jurkat CD16 activadas por un anti-CD20

A- Esquema de activación de célula Jurkat.

B- Unas células Jurkat CD16 han sido mezcladas con diferentes anticuerpos anti-CD20 (anticuerpo murino CAT13 y anticuerpo quimérico C273) en presencia de células Raji y de PMA. Después de una noche de incubación, la liberación de IL-2 en el sobrenadante ha sido cuantificada mediante ELISA.

Figura 9: Liberación de IL2 por Jurkat CD16 activadas por un anti-D

A- Esquema de activación de célula Jurkat.

B- Unas células Jurkat CD16 han sido mezcladas con diferentes anticuerpos anti-D en presencia de hematíes Rhesus+ y de PMA. Después de una noche de incubación, la liberación de IL-2 en el sobrenadante ha sido cuantificada mediante ELISA. DF5 expresado en YB2/0 y T125 expresado en CHO Lec13 inducen una fuerte secreción de IL2.

Figura 10: Recta de correlación entre ADCC (Tegolina 500 μ g/pocillo y anti-D a 7,5 ng/pocillo) y el ensayo Jurkat IL2.

Figura 11: Secreción de IL-8 por las células mononucleadas.

Figura 12: Inducción de la secreción de TNF alfa, IL-6 y TGF beta por las células mononucleadas.

Figura 13: Inducción de la secreción de citoquinas por los polinucleares.

Figura 14: Inducción de la secreción de IFN gamma, TNF alfa e IP10 por las NK.

Ejemplo 1: Ensayo Jurkat CD16

Anticuerpos:

Anticuerpos policlonales WinRho, anticuerpo monoclonal DF5-EBV, anticuerpo monoclonal DF5-YB2/0.

Principio:

Este ensayo evalúa la capacidad de los anticuerpos anti-D para fijarse sobre el receptor CD16 (Fc gamma RIII) expresado en las células Jurkat CD16 y para inducir la secreción de IL2.

Este ensayo consiste en poner en contacto en placas de 96 pocillos: los anticuerpos anti-D, los hematíes Rhesus positivo tratados con papaína, las células Jurkat CD16 y PMA.

Después de una noche de incubación a 37°C, se centrifugan los P96 y se dosifica en el sobrenadante la cantidad de IL2 segregada.

Material

Anticuerpos de control positivo: Poli-D WinRho, DF5 YB2/0.

Anticuerpos de control negativos: DF5.

Hematíes Rhesus positivo

Células Jurkat CD16.

Kit de dosificación de IL2: Cuantiquina de R/D.

Método

Tratamiento con papaína de los hematíes.

1 ml de residuo de hematíes diluidos en PBS incubado con 1 ml de una disolución de papaína (1 mg/ml) durante 10 minutos a 37°C. Después, 3 lavados en H₂O-NaCl 0,15 M.

Mezcla de reacción:

- Anticuerpos: 50 µl de una dilución a 150 ng/ml en IMDM 5% SVF

- PMA 50 µl de una dilución a 40 ng/ml en IMDM 5% SVF

- Hematíes tratados con papaína. 50 µl a $8 \cdot 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF

- Jurkat CD16. 50 µl a $2 \cdot 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF

Incubación durante 1 noche a 37°C

Después, centrifugación de las placas, extracción de 100 µl de sobrenadantes y dosificación de IL2 con el kit comercial. Lectura a 450 nm.

Se proporcionan los valores (en pg/ml) en forma de histograma para cada muestra.

Ejemplo 2: Correlación *in vitro* entre ADCC y liberación de IL-2 por Jurkat CD16.

Para este estudio, se han comparado 3 anticuerpos monoclonales anti-D.

Mab DF5-EBV ha sido producido mediante unos linfocitos B humanos obtenidos en un donante inmunizado D-negativo e immortalizados mediante transformación con EBV. Este anticuerpo ha sido utilizado como control negativo debido a que ha mostrado que es incapaz de eliminar los glóbulos rojos Rhesus positivo de la circulación durante un ensayo clínico.

El anticuerpo monoclonal (Mab) DF5-YB2/0 ha sido obtenido expresando la secuencia primaria de DF5-EBV en la línea YB2/0. El anticuerpo monoclonal R297 y otros anticuerpos recombinantes han sido asimismo expresados en YB2/0.

Estos anticuerpos se ensayan *in vitro* por su capacidad para inducir una lisis de los glóbulos rojos tratados con papaína utilizando unas células mononucleadas (PBL) como efector.

Todos los ensayos han sido llevados a cabo en presencia de inmunoglobulinas humanas (IVIg) de manera que se reconstituyan las condiciones fisiológicas.

Se cree que las IVIg se unen con una alta afinidad al FcgammaRI (CD64). Los dos Mab DF5-YB2/0 y R297 inducen una lisis de los glóbulos rojos a un nivel comparable al de los anticuerpos WinRho. Por el contrario, el Mab DF5-EBV es completamente ineficaz.

En una segunda serie de experimentos, unas células NK purificadas y unos glóbulos rojos no tratados han sido utilizados como efector y dianas respectivamente. Después de 5 horas de incubación, los Mab antiD-R297 y DF5-YB2/0 han sido capaces de provocar la lisis de los glóbulos rojos, mientras que DF5-EBV sigue siendo ineficaz.

En estos dos experimentos, la lisis de los glóbulos rojos ha sido inhibida por el anticuerpo 3G8 dirigido contra el FcgammaRIII (CD16).

En resumen, estos resultados demuestran que el ADCC provocado por el anticuerpo R297 y el anticuerpo DF5-YB2/0 implica el FcgammaRIII expresado en la superficie de las células NK.

En el marco de la invención, una tercera serie de experimentos ha destacado un ensayo *in vitro* con la ayuda de célula Jurkat CD16 para evaluar la eficacia de anticuerpos anti-D. Los anticuerpos han sido incubados durante la noche con unos glóbulos rojos Rhesus positivo y unas células Jurkat CD16. La liberación de IL-2 en el sobrenadante ha sido evaluada mediante ELISA. Se ha observado una fuerte correlación entre el ADCC y la activación de las células Jurkat, lo cual implica que este ensayo se puede utilizar para realizar la discriminación de los anticuerpos anti-D en función de su reactividad frente a FcgammaRIII (CD16).

Las mismas muestras son evaluadas en ADCC y en el ensayo Jurkat IL2. Los resultados se expresan en porcentaje del anticuerpo de referencia "LFB-R297". La curva de correlación entre las 2 técnicas tiene un coeficiente $r^2=0,9658$ (figura 10).

En conclusión, estos datos muestran la importancia de las modificaciones post-traduccionales de la estructura de los anticuerpos para su actividad ADCC específica del FcgammaRIII. La liberación de citoquinas tales como IL-2 refleja esta actividad.

Ejemplo 3: Activación de células NK y producción de IL2 y de IFN γ .

Modelo de estudio: Células NK purificadas a partir de sangre periférica. Aplicaciones: refuerzo de una respuesta anti-tumoral. La IL1 induce una activación de los linfocitos T y de las células NK, pudiendo a su vez estimular la proliferación celular. El IFN γ estimula la actividad de las CTL y puede reforzar la actividad de los macrófagos.

Ejemplo 4: Activación de monocitos macrófagos y producción de TNF y de IL-1Ra

Aplicaciones: refuerzo de la fagocitosis e inducción de propiedades anti-inflamatorias. El TNF estimula la proliferación de los macrófagos y de los linfocitos que infiltran los tumores. El IL-1Ra es una citoquina producida por los macrófagos que entra en competición con IL1 a nivel de su receptor y ejerce así un efecto anti-inflamatorio.

Ejemplo 5: Activación de células dendríticas y producción de IL10

Aplicaciones: inducción de una tolerancia específica a ciertos antígenos. La IL10 es una molécula inhibidora de la activación de diferentes células efectoras y de la producción de citoquinas.

Ejemplo 6: Inducción de la secreción de citoquinas por diferentes células efectoras.

Se han estudiado tres poblaciones celulares: las polinucleares, las células mononucleadas y las células NK. Las síntesis de citoquinas son dependientes de la presencia de la diana. Existe poca diferencia en los perfiles de las citoquinas inducidas por el anticuerpo R297 y del anticuerpo policlonal anti-D. AD1 es muy frecuentemente no inductor de secreción de citoquinas.

Resultados:

6.1 El anticuerpo monoclonal R297 y el policlonal WinRho inducen una secreción importante de IL8 en presencia de células mononucleadas. Esta secreción es dependiente de la concentración de anticuerpos y de la presencia de la diana antigénica. El anticuerpo AD1 es mucho menos efector (figura 11), es decir, capaz de inducir la producción de citoquinas.

Con unas células mononucleadas (CMN), el anticuerpo monoclonal R297 y el policlonal WinRho inducen una secreción importante de TNF alfa, en menor medida aunque superior a AD1 una secreción de IL6, de IFN gamma, de IP10, de TNF alfa y de TGF beta. A la más alta concentración de anticuerpos, esta secreción de IL6, IFN gamma, IP10, aumenta, pero disminuye para el TNF alfa y el TGF beta (figura 12).

6.2 El anticuerpo monoclonal R297 y el policlonal WinRho inducen una secreción muy baja, pero superior a AD1, de IL2, de IFN gamma, de IP10 y de TNF por las polinucleares. Esta secreción es dependiente de la concentración de anticuerpos (figura 13).

- 5 6.3 El anticuerpo monoclonal R297 y el policlonal WinRho inducen una secreción importante de IFN gamma, de IP10 y de TNF por las células NK. Esta secreción es dependiente de la concentración de anticuerpos (figura 14).

Ejemplo 7: Anticuerpos anti-CD20 y anti-HLA DR quiméricos optimizados producidos en YB2/0

10 Introducción

Los primeros resultados han mostrado que los anticuerpos anti-D producidos en YB2/0 así como los anticuerpos policlonales utilizados en clínica inducían la producción de citoquinas, en particular de TNF alfa y de interferón gamma (IFN gamma) a partir de células NK purificadas o de células mononucleadas. Por el contrario, otros anticuerpos anti-D, producidos en otras líneas celulares son negativos en ADCC y resultan incapaces de inducir esta secreción.

- 15 Los resultados complementarios siguientes muestran que este mecanismo no es exclusivo a los anti-D en presencia de hemáties Rhesus positivo sino se que aplica asimismo a los anticuerpos anti-CD20 y anti-HLA DR expresados en YB2/0. La expresión en CHO confiere al anticuerpo unas propiedades activadoras menos importantes. Esto está en correlación con los resultados obtenidos en ADCC.

Material

25 *Anticuerpos*

Anti-CD20: el anticuerpo quimérico anti-CD20 transfectado en YB2/0 se compara con un anticuerpo comercial anti-CD20 producido en CHO (Rituxan).

- 30 Anti-HLA DR: la misma secuencia que codifica para el anticuerpo quimérico anti-HLA DR se transfecta en CHO (B11) o YB2/0 (4B7).

Células diana: células Raji que expresan en su superficie los antígenos CD20 y HLA-DR.

- 35 *Células efectoras:* células NK humanas purificadas mediante selección negativa a partir de bolsa de sangre humana.

Método

- 40 Se incuban diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD20 o anti-HLA DR con las células Raji (diana) y las células NK (efectoras). Después de 16 horas de incubación, las células se centrifugan. Los sobrenadantes se dosifican en TNF alfa e IFN gamma.

Resultados:

- 45 7.1 *TNF alfa:* Los resultados expresados en pg/ml de TNF alfa dosificado en los sobrenadantes. En abscisas figuran las diferentes concentraciones de anticuerpos añadidos en la mezcla de reacción (figura 15).

- 50 Los anticuerpos anti-CD20 y anti-HLA DR quiméricos producidos en YB2/0 inducen unos porcentajes más importantes de TNF en presencia de su diana (Raji) con respecto a los mismos anticuerpos producidos en CHO. La cantidad de TNF alfa es muy dosis-dependiente de la concentración de anticuerpos añadida. A 10 ng/ml de anticuerpos, se induce 5 veces más TNF alfa con los anticuerpos producidos en YB2/0 con respecto a los anticuerpos producidos en CHO.

- 55 7.2 *IFN gamma:* Los resultados se expresan en pg/ml de IFN gamma dosificado en los sobrenadantes. En abscisas figuran las diferentes concentraciones de anticuerpos añadidos en la mezcla de reacción (figura 16).

- 60 Los anticuerpos anti-CD 20 y anti-HLA DR quimérico producidos en YB2/0 inducen unos porcentajes más importantes de IFN gamma en presencia de su diana (Raji) con respecto a los mismos anticuerpos producidos en CHO. La cantidad de IFN gamma es muy dosis-dependiente de la concentración de anticuerpos añadidos. A todas las concentraciones utilizadas (0 a 200 ng/ml) el anticuerpo anti-HLA DR producido en CHO no induce ninguna secreción de IFN gamma, mientras que 40 ng/ml del anticuerpo producido en YB2/0 induce alrededor de 1.000 pg/ml de IFN gamma.

- 65 Para el anticuerpo anti-CD20, se necesita menos de 10 ng/ml del anticuerpo producido en YB2/0 y 200 ng/ml del anticuerpo producido en CHO para inducir 300 pg/ml de IFN gamma (figura 16).

Referencias

- 5 Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y. y Takahashi, N. A comparative study of the N-linked oligosaccharides structure of human IgG Subclass proteins. *Biochem. J.*, 268: 529-537 (1990).
- Leatherbarrow, R.J., Rademacher, T.W., Dwek, R.A., Woof, J.M., Clark, A., Burton, D.R., Richardson, N. y Feinstein, A. Effector functions of monoclonal aglycosylated mouse IgG2a; binding and activation of complement component C1 and interaction with human Fc receptor. *Molec. Immun.* 22, 407-415 (1985).
- 10 Lund, J., Tanaka, T., Takahashi, N., Sarmay, G., Arata, Y. y Jefferis, R. A protein structural change in aglycosylated IgG3 correlates with loss of hu Fcγ RI and hu FcγRIII binding and/or activation. *Molec. Immun.* 27, 1145-1153 (1990).
- 15 Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T. y Kobata, A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316: 452-457 (1985).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para evaluar la eficacia ADCC mediada por el CD16 de un anticuerpo monoclonal o policlonal, que comprende la puesta en contacto de células efectoras Jurkat transfectadas con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16 en un medio de reacción en presencia de dicho anticuerpo y del antígeno de dicho anticuerpo, y una medición de la cantidad de IL-2 producida por las células efectoras Jurkat transfectadas con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16, caracterizado porque la secreción de IL-2 por las células Jurkat transfectadas con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16 está correlacionada con la actividad ADCC mediada por el CD16.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal de especificidad anti-Rh D del glóbulo rojo humano.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque comprende además una etapa de selección de los anticuerpos para los cuales se observa un aumento superior a 100%, 250%, 500% o 1.000% del porcentaje de liberación de IL-2 con respecto al control en ausencia de anticuerpos o en presencia de un anticuerpo dado como referencia negativa.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la mezcla de reacción comprende inmunoglobulinas humanas (IVIg).

Ensayo ADCC CMN sobre hematías

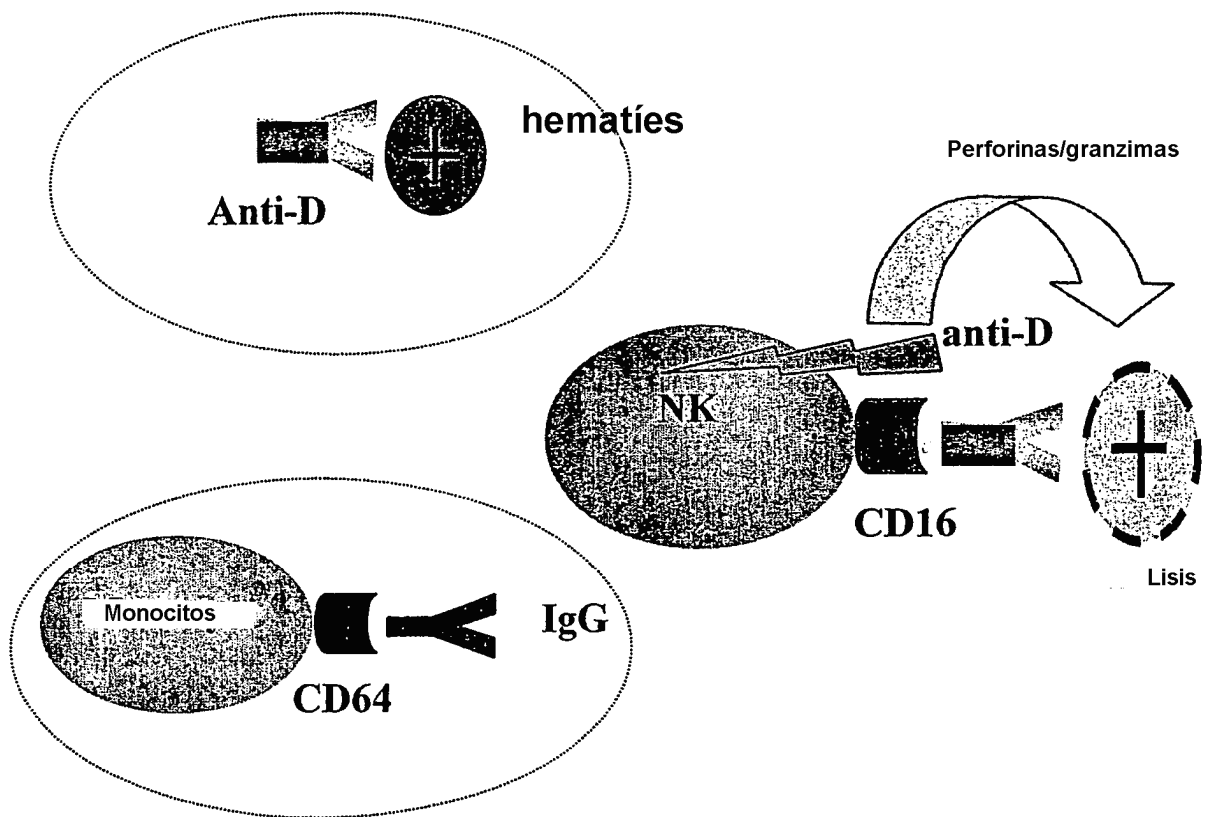


Figura 1

Ensayo ADCC NK sobre hematíes

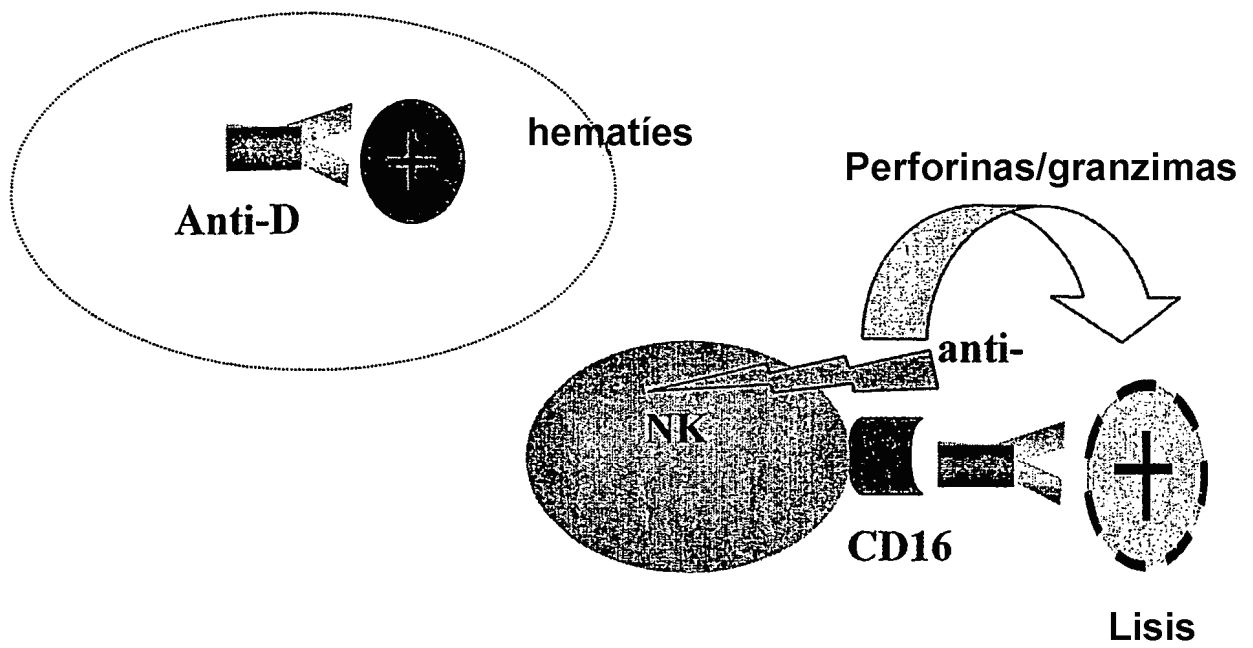


Figura 2

**ADCC NK: Inhibición del ADCC por el anti-CD16: 3G8
(Tox 324 02 015)**

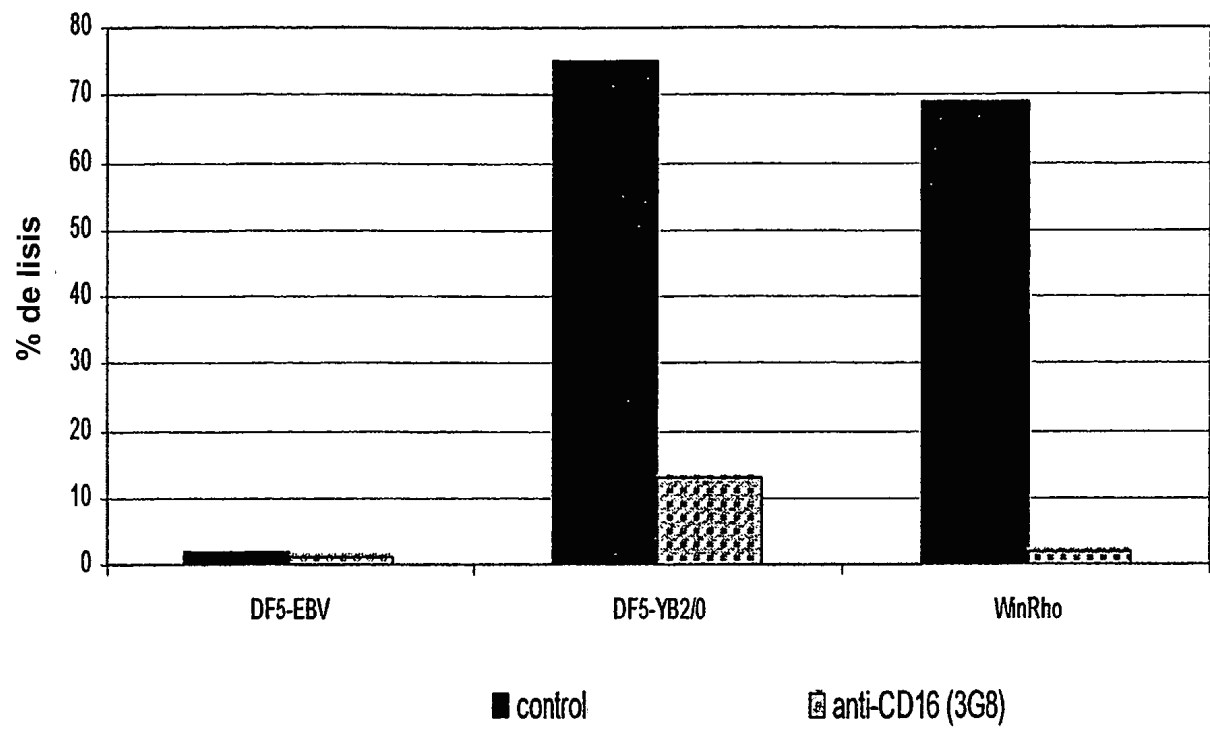


Figura 3

**Ensayo Jurkat CD16: activación inducida por un anti-Rhesus D y
producción de IL2**

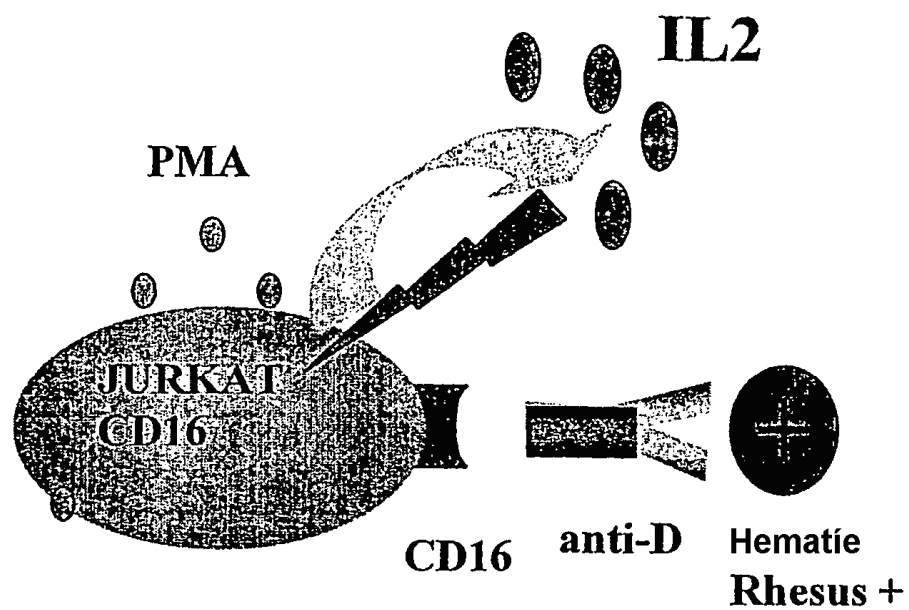


Figura 4

Secreción de IL2 por Jurkat CD16 inducida por los anticuerpos DF5-EBV, DF5-YB20 y WinRho

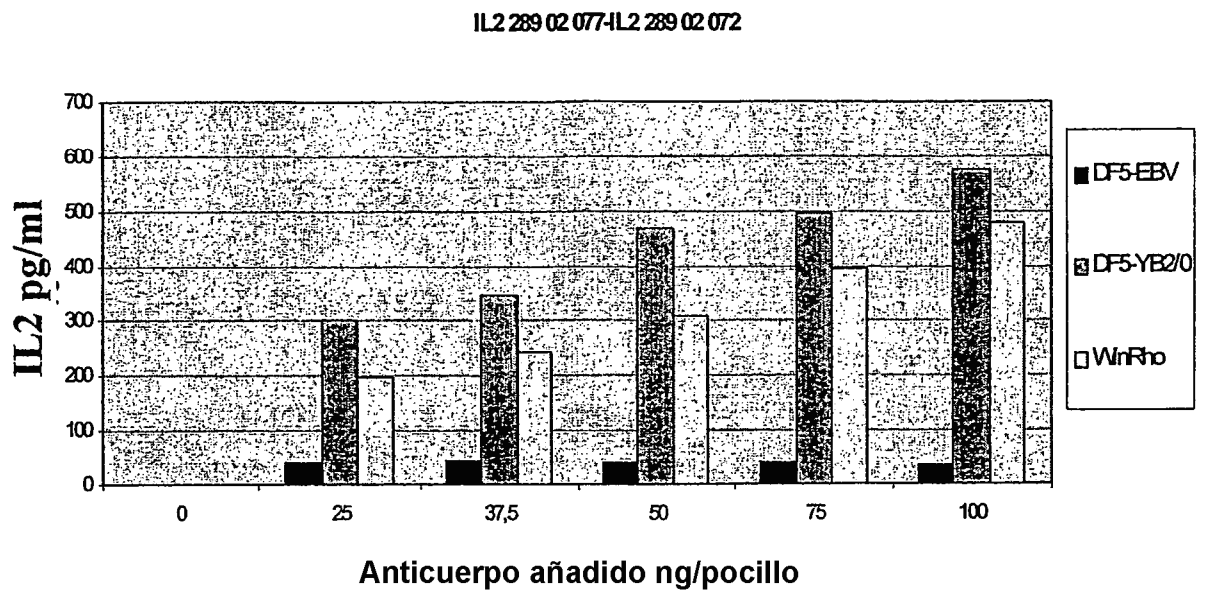


Figura 5

Activación de leucocitos por unos anti-D

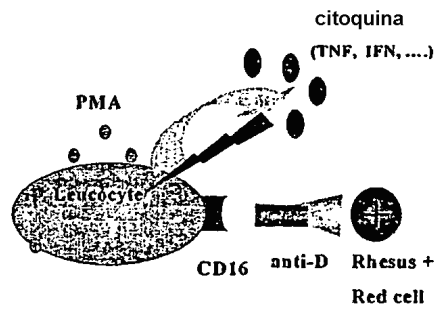


Figura 6A

Liberación de citoquinas (IL2, IFN y TFN) por unos leucocitos activados por unos anticuerpos en presencia de sus dianas

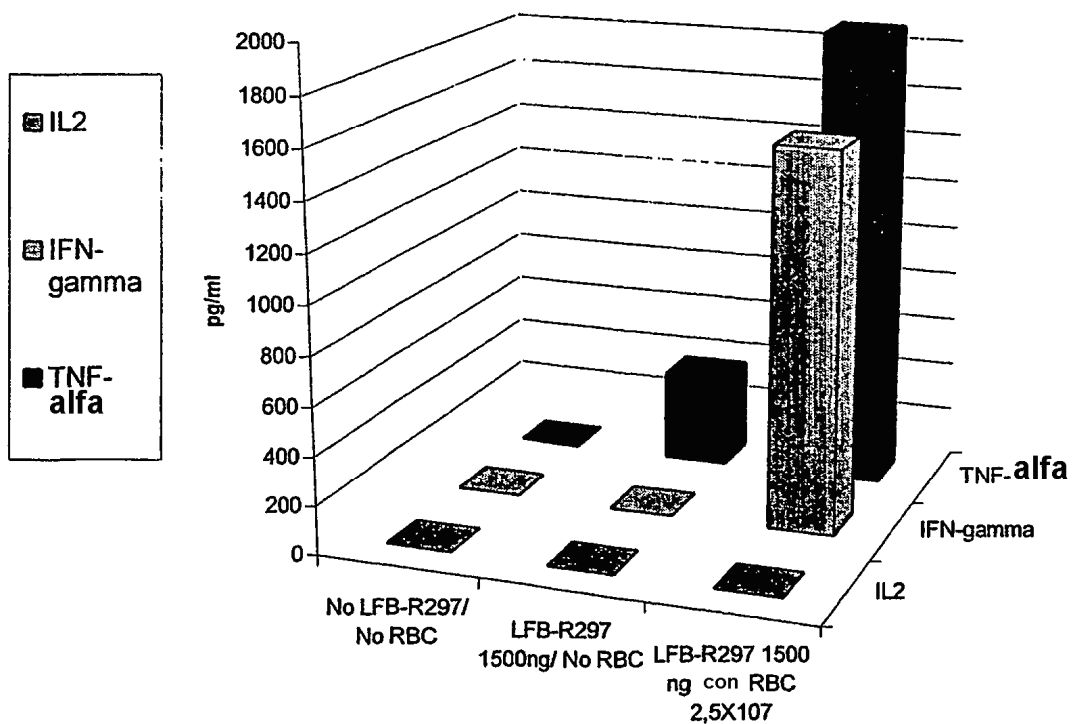


Figura 6B

Inducción de la secreción de citoquina (IFN, TFN) por unas células NK activadas por unos anticuerpos anti-D y sus dianas (LFB-R297-RBC)

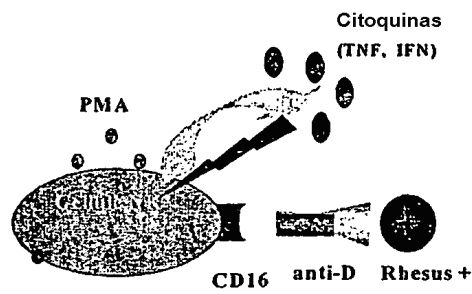


Figura 7A

Liberación de citoquinas (IFN, TFN) por las células NK activadas por unos anticuerpos en presencia de sus dianas (LFB-R297-RBC)

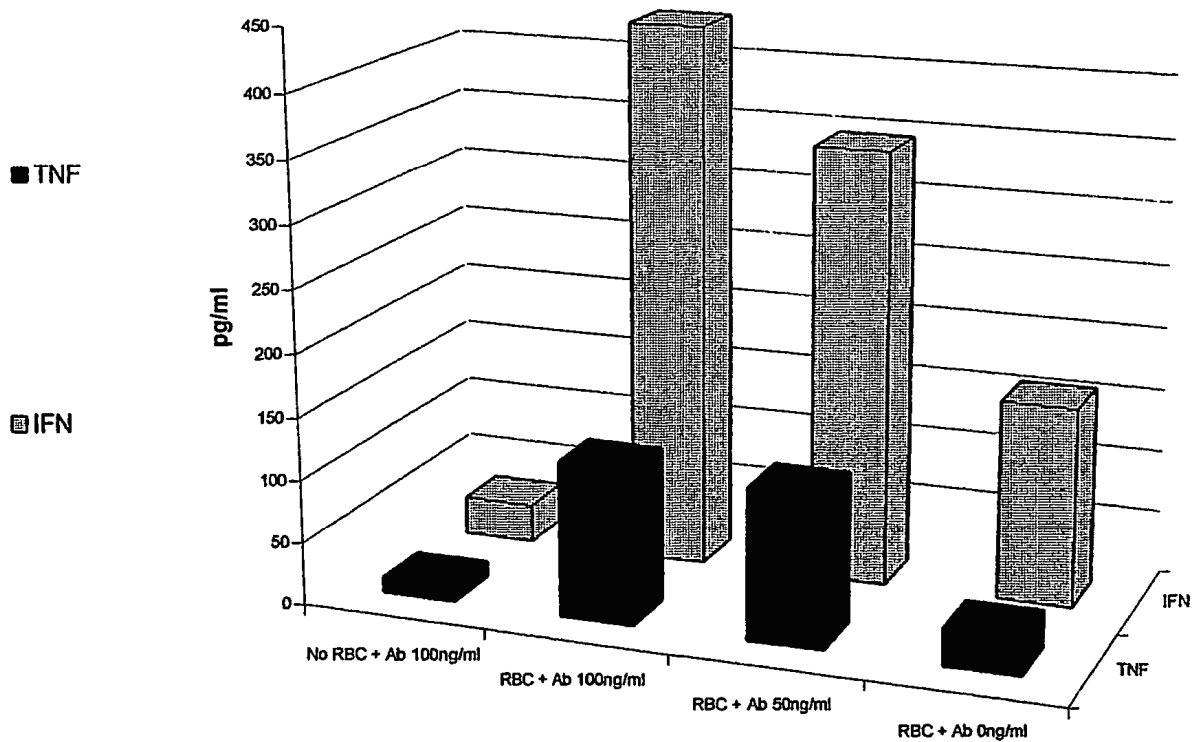


Figura 7B

Liberación de IL2 de Jurkat CD16 inducida por unos anticuerpos anti-CD20

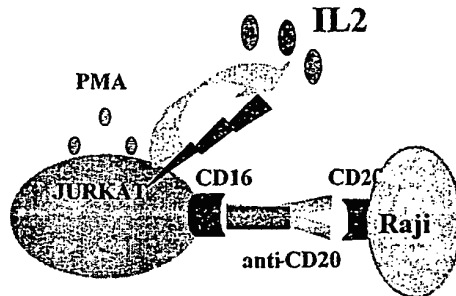


Figura 8A

Secreción de IL2 por Jurkat CD16 activada por el anti-CD20 CAT 13 o C273

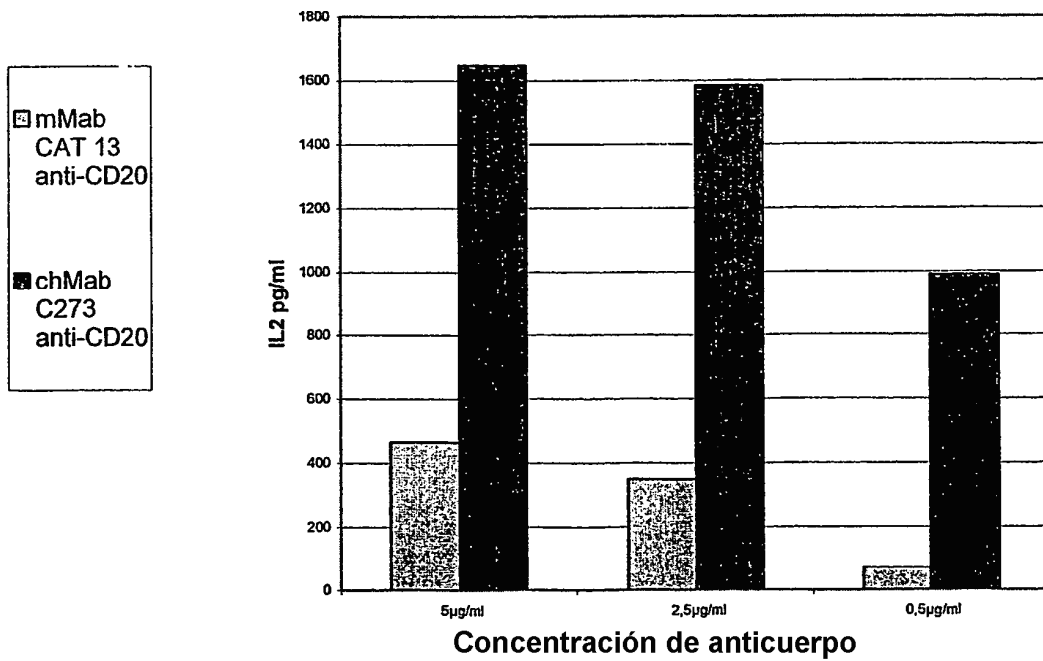


Figura 8B

Liberación de IL2 de Jurkat CD16 inducida por unos anticuerpos anti-D

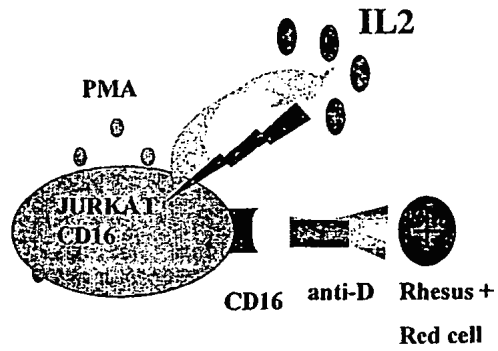


Figura 9A

Secreción de IL2 por Jurkat CD16 activada por diferentes anti-Rhesus D

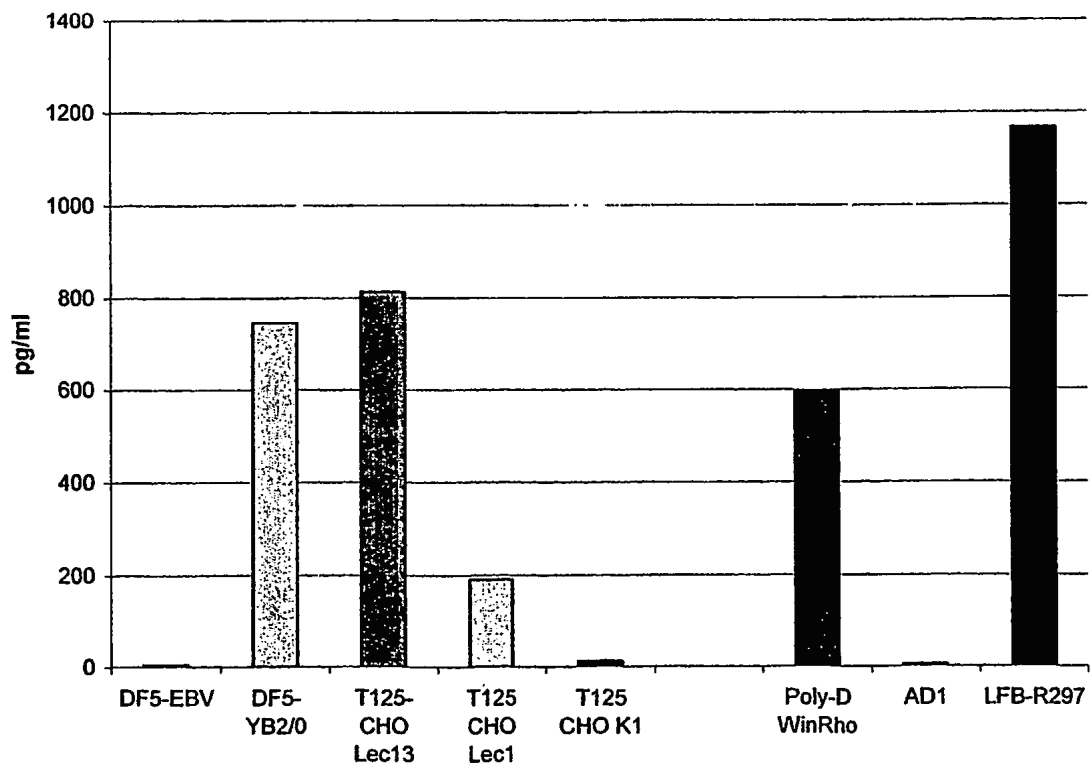


Figura 9B

Correlación entre el ensayo ADCC en presencia de Tegelina y la secreción de IL2 por Jurkat CD16. Anticuerpo: LFB-R297

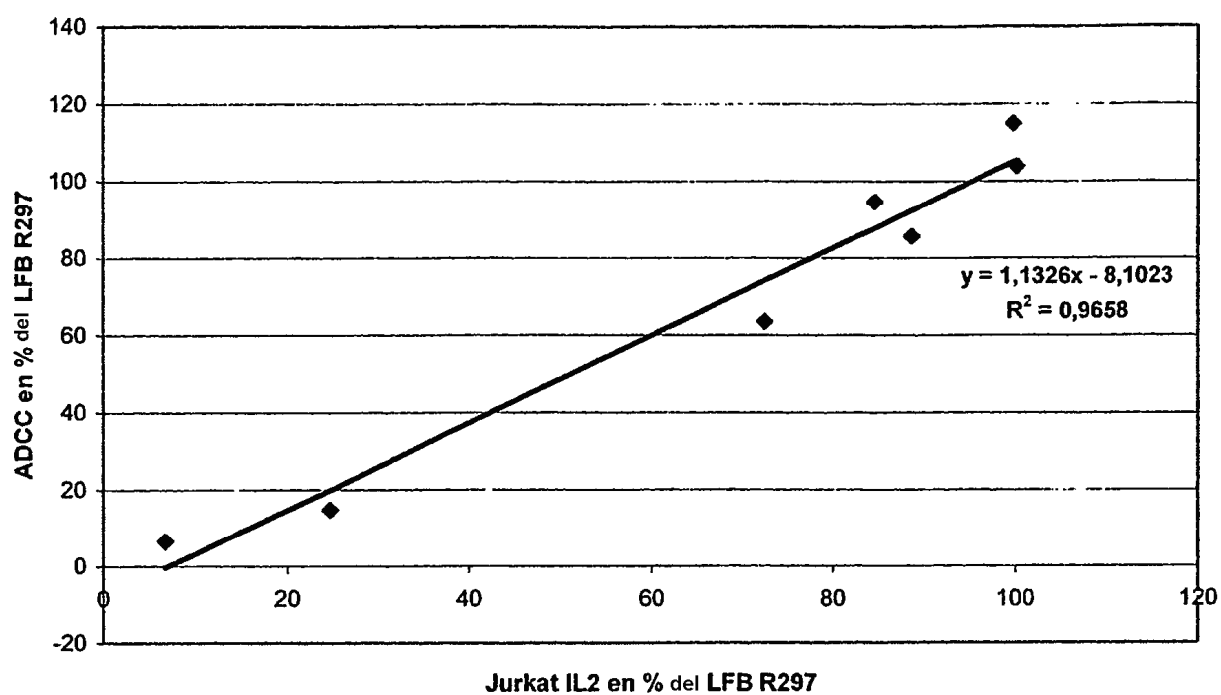


Figura 10

IL8 segregado por los CMN en presencia o en ausencia de diana

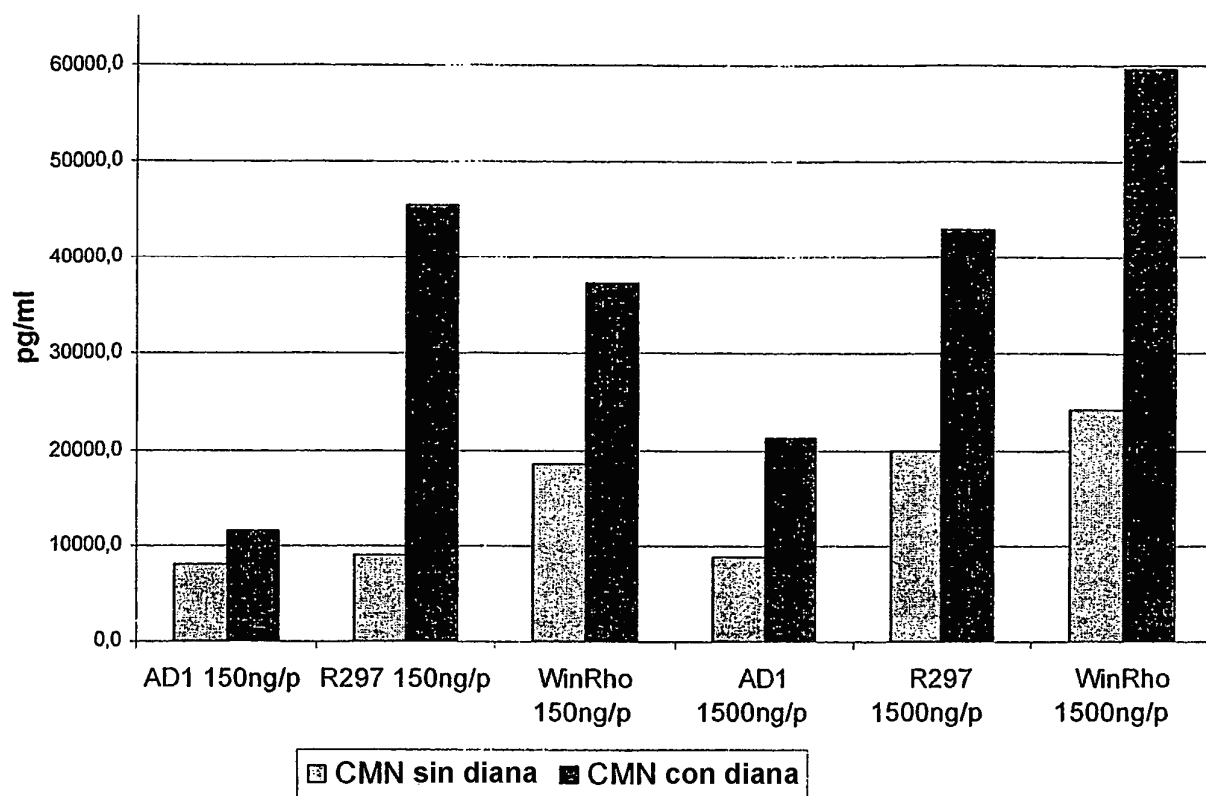


Figura 11

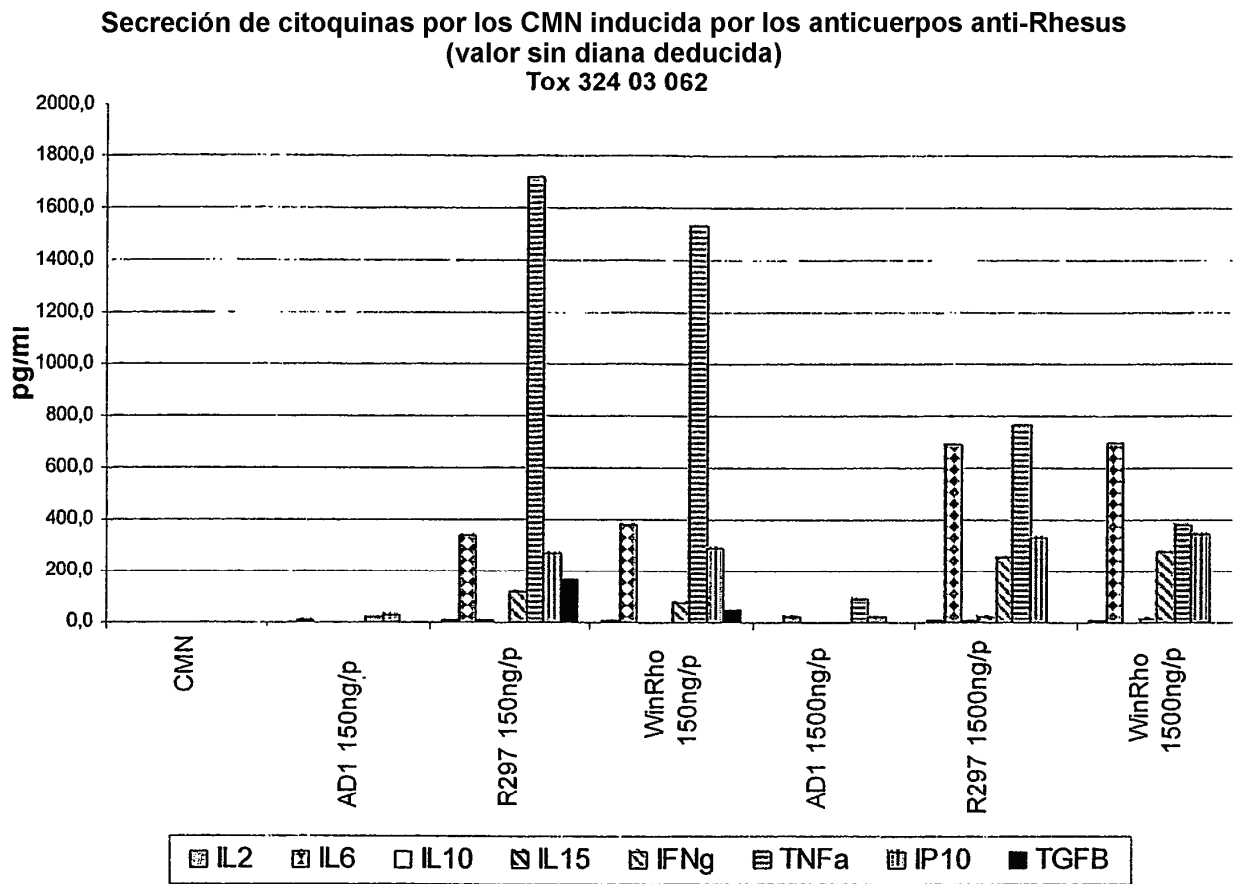


Figura 12

Secreción de citoquinas por los polinucleares inducida por los anticuerpos anti-Rhesus

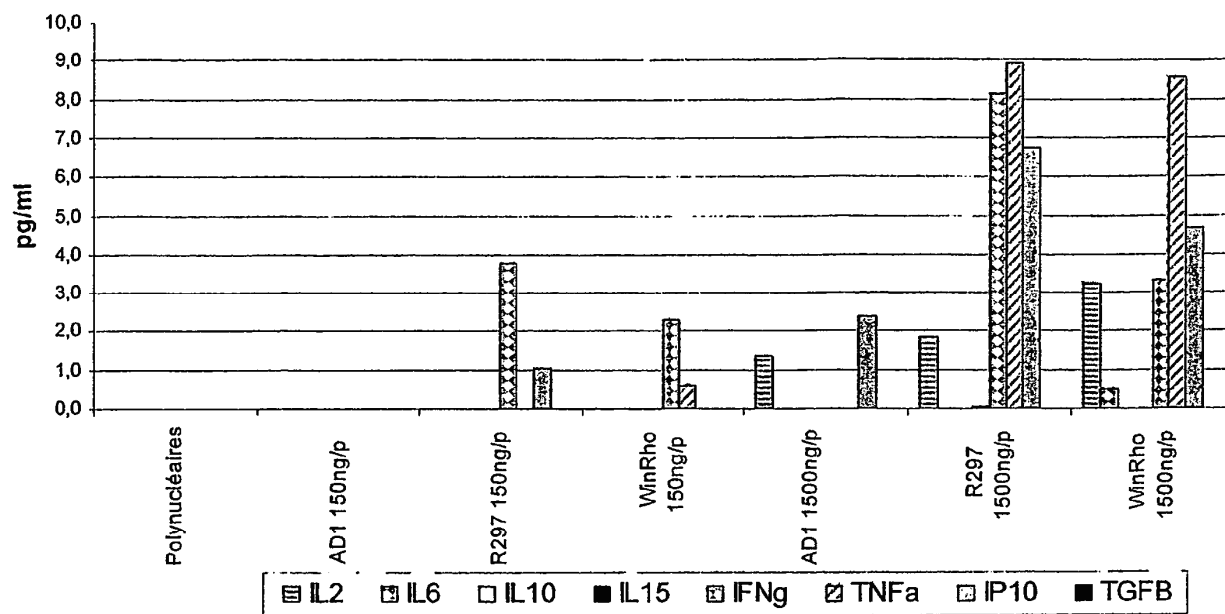


Figura 13

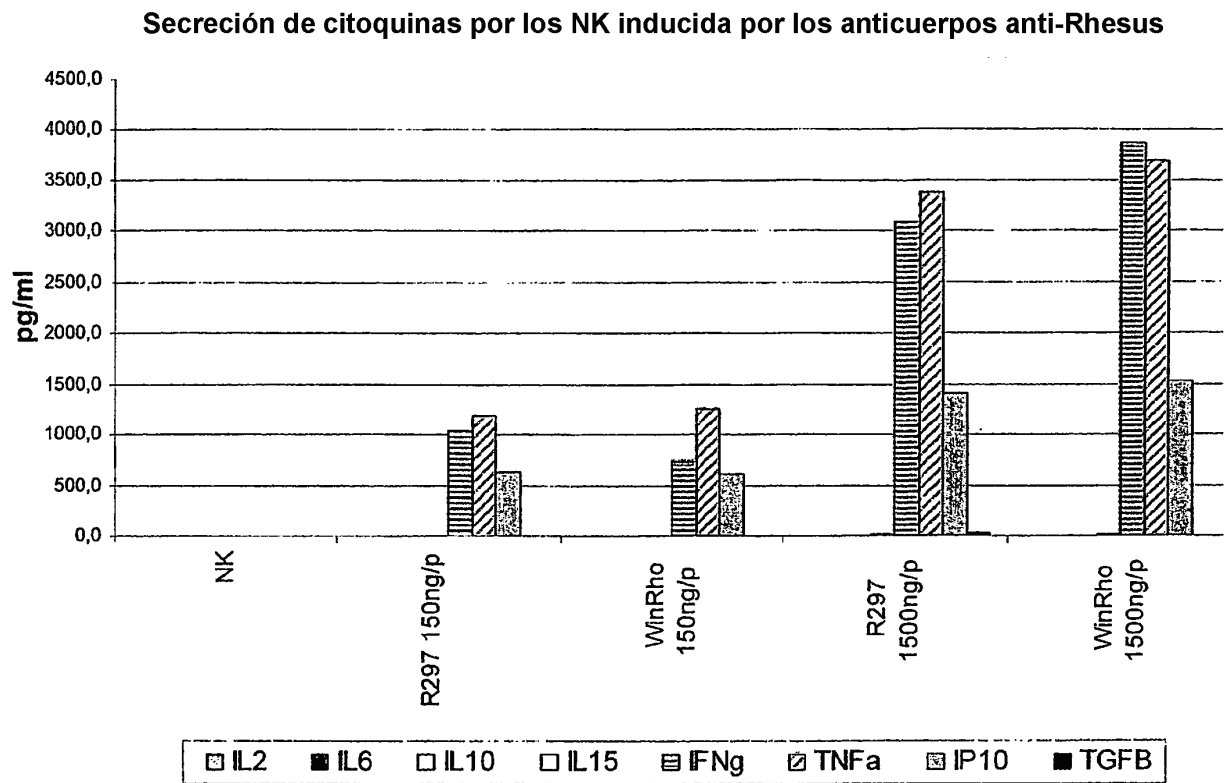


Figura 14

Secreción de TNF alfa por las células NK inducida por los anticuerpos anti-CD20 y anti-HLA DR expresados en CHO y YB2/0 (324 03 082)

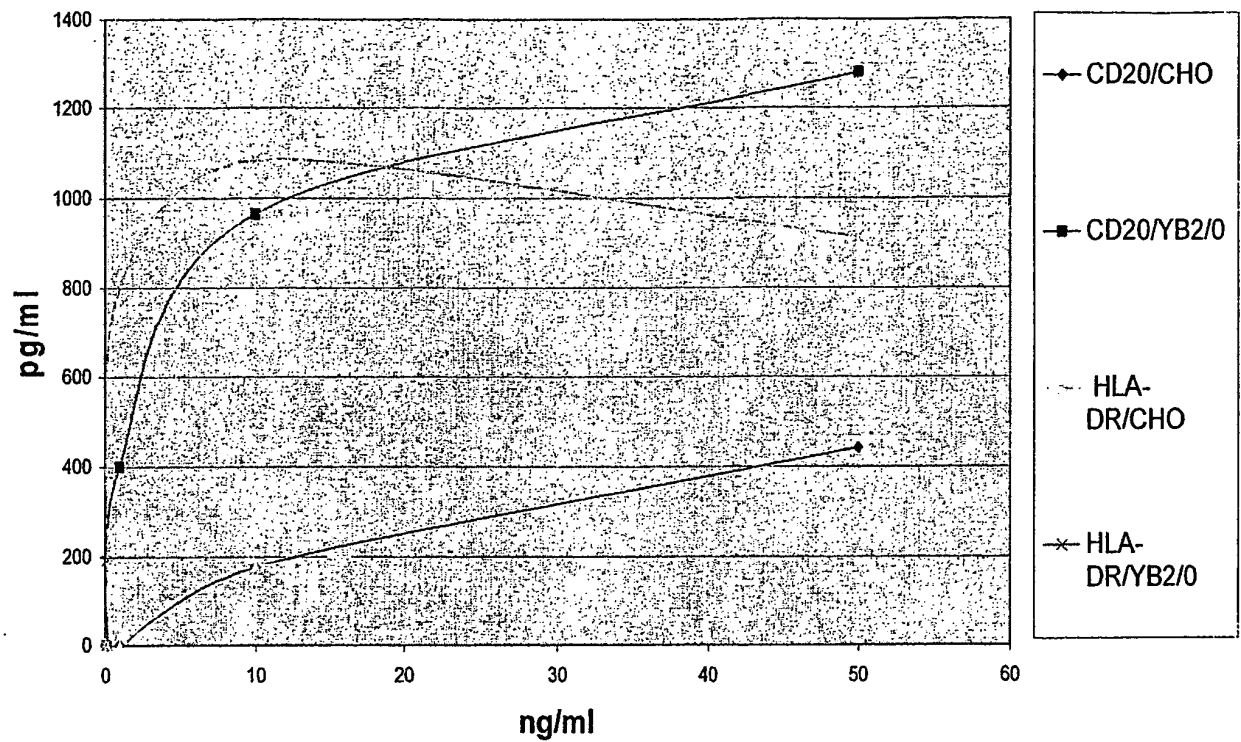


Figura 15

Secreción de IFN gamma por las células NK inducida por los anticuerpos anti-CD20 y anti-HLA DR expresados en CHO y YB2/0 (324 03 082)

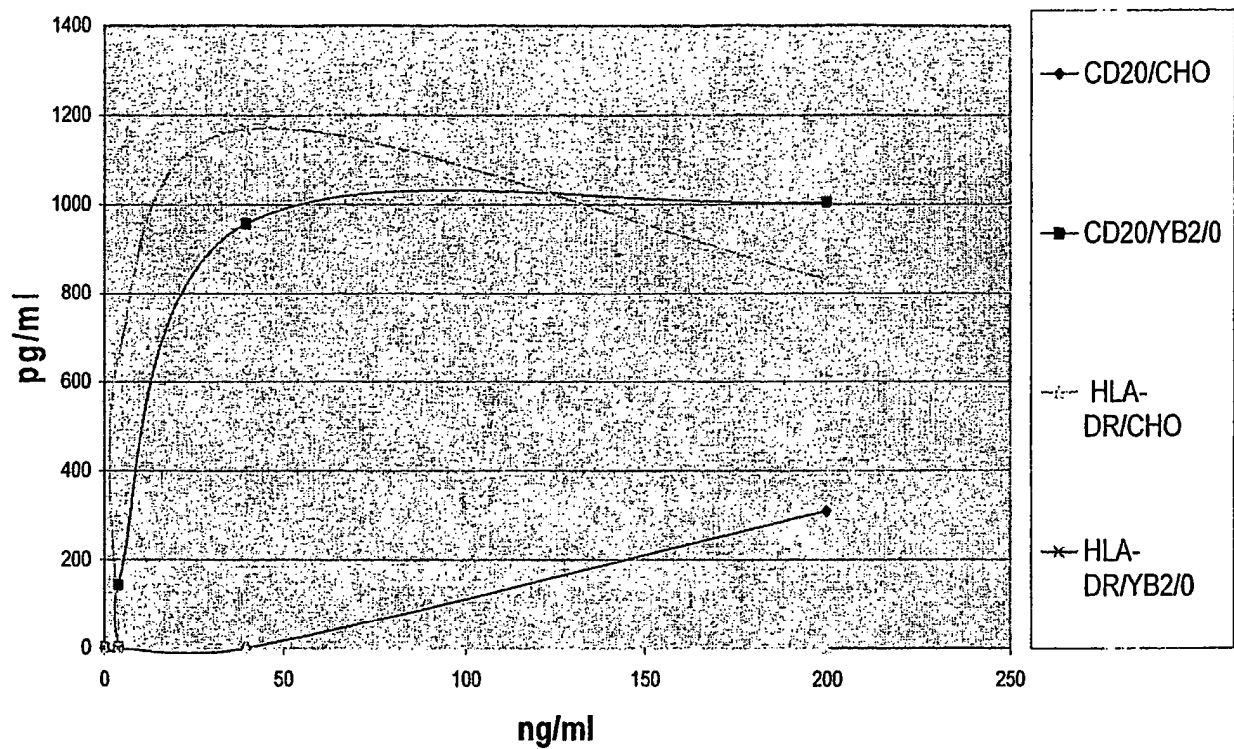


Figura 16