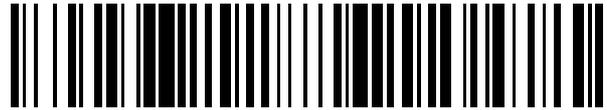


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 356**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08845822 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2220488**

54 Título: **Método de realización de un ensayo para neutralizar anticuerpos**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 983813 P

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

26.06.2013

73 Titular/es:

**LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
BIOMONITOR LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TOVEY, MICHAEL y
LALLEMAND, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

TRIGO PECES, José Ramón

ES 2 409 356 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 de realización de un ensayo para neutralizar anticuerpos.

5 **Sector de la técnica**

[0001] La presente invención se refiere a un ensayo de genes reporteros y un kit para determinar en una muestra la presencia y/o la cantidad de una molécula que desencadena la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular. La presente invención se refiere además a una célula que puede usarse en dicho ensayo y a un método de preparación de dicha célula.

Estado de la técnica

[0002] Las proteínas de la superficie celular permiten la transducción intracelular de señales extracelulares. Las proteínas de la superficie celular ofrecen a las células eucariotas y procariotas un medio para detectar señales extracelulares y transducirlas a nivel intracelular de una manera que resulte en una respuesta celular o una respuesta de un conjunto de tejido u órgano. Las proteínas de la superficie celular, al transmitir intracelularmente información acerca del medio extracelular a través de vías intracelulares específicas, inducen una respuesta adecuada a un estímulo determinado. Esta respuesta puede ser inmediata y transitoria, lenta y continuada, o una combinación de ellas. Debido a un conjunto de variadas proteínas de la superficie de su membrana, las células eucariotas son enormemente sensibles a su entorno.

[0003] Las moléculas de señal extracelular, tales como las citoquinas, los factores de crecimiento, ciertas hormonas, los vasodilatadores y los neurotransmisores, ejercen sus efectos (al menos parcialmente) por medio de la interacción con las proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, algunas moléculas de señal extracelular causan cambios en la transcripción de los genes diana por medio de cambios en los niveles de mensajeros secundarios, tales como cAMP. Otras señales, al activar la expresión de los genes, indirectamente alteran la expresión de los genes, tales como los genes inmediatos-tempranos que codifican proteínas reguladoras que, a su vez, activan la expresión de otros genes codificadores de proteínas de regulación transcripcional. Otras moléculas de señal extracelular provocan la activación de transductores de señales citoplasmáticas latentes y de activadores de la proteína de transcripción (STAT), que mejoran la transcripción de conjuntos específicos de genes.

[0004] Entre las proteínas de la superficie celular que responden a las señales extracelulares e inician los procesos que conducen a esta variada respuesta y expresión de los genes, se encuentran los receptores de la superficie celular y los canales iónicos. Los canales iónicos y los receptores localizados en la superficie celular son proteínas ubicuas y fisiológicamente importantes de la membrana de la superficie celular. Desempeñan un papel fundamental en la regulación de los niveles intracelulares de varios iones y sustancias químicas, muchos de los cuales son importantes para la viabilidad y el funcionamiento celular.

40 Receptores de la superficie celular

[0005] Los receptores localizados en la superficie celular son proteínas transmembranales que se unen a moléculas de señal extracelular o que detectan cambios en el medio extracelular y transmiten la señal a través de vías de transducción de señales para generar una respuesta celular. Los receptores de la superficie celular se unen a moléculas de señal circulantes, tales como citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, etc., como paso inicial en la activación de numerosas vías intracelulares. Los receptores se clasifican según criterios estructurales o en función del tipo determinado de vía que se induce. Entre estas clases de receptores existen clases de receptores de citoquinas que incluyen aquellos que se unen a factores de crecimiento y presentan una actividad intrínseca de tirosina quinasa, tales como los receptores del factor de crecimiento de unión a heparina (HBGF), la superfamilia de receptores de inmunoglobulinas, la superfamilia de receptores de citoquinas/hematopoyetinas, la superfamilia de receptores de factores de crecimiento nervioso, otros receptores de tirosina o serina quinasa, y aquellos que se acoplan a proteínas efectoras a través de proteínas de regulación de unión a nucleótidos de guanina, denominados respectivamente receptores acoplados a proteínas G y proteínas G.

[0006] Las citoquinas son mensajeros intercelulares que coordinan la comunicación entre las células de un tejido concreto (por ejemplo, las interacciones entre anticuerpos y células T del sistema inmunitario) y sirven para modular o modificar la respuesta biológica. Son pleiotrópicas y tienen un amplio espectro de efectos en más de un tipo de célula o tejido. Los receptores para citoquinas se agrupan genéricamente en dos clases, donde los receptores de la Clase I incluyen receptores que se unen a distintas interleuquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15), a la eritropoyetina (EPO), a la hormona del crecimiento (GH), al factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), al factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), al factor inhibitorio de leucemia (LIF), y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el TNF α , el TGF β y el ligando Fas, y los receptores para citoquinas de la Clase II incluyen receptores que se unen al interferón (IFN) α/β , IFN γ y a la IL-10.

65 Receptores de interferón

[0007] Los interferones humanos (IFN) son una familia de citoquinas helicoidales homólogas que se dividen en tres clases (tipo I, II y III) en función de la homología de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos. Los IFN humanos de Tipo I son el IFN α , el IFN β , el IFN ϵ , el IFN κ y el IFN ω . Los IFN α humanos incluyen un grupo de proteínas estrechamente relacionadas codificadas como mínimo por 12 genes IFN α funcionales. Los IFN β , IFN ϵ , IFN κ e IFN ω se codifican por genes individuales con menor relación entre sí. El IFN de Tipo II (o IFN γ) se codifica por un gen no relacionado y se une a un receptor distinto de la superficie celular (De Maeyer et al., 1988; Pestka et al., 1987; y Díaz et al., 1993). Recientemente se ha definido un nuevo grupo de interferones denominados IFN λ o IFN de Tipo III. Este grupo consiste de los tres IFN λ 1, IFN λ 2 e IFN λ 3, también denominado interleuquina-29 (IL-29) (λ 1) e IL-28A/B (λ 2/3) (Sheppard et al., 2003; y Ank et al., 2006).

[0008] Los IFN de Tipo I se unen a un receptor común, como demuestra su capacidad para competir entre sí por unirse al receptor (Pestka et al., 1987; Branca et al., 1981; y Merlin et al., 1985). El receptor de interferón de Tipo I es el que dispone de más ligandos naturales, unos 14 en total, de todos los receptores de citoquinas conocidos. La unión de los interferones a su correspondiente receptor de la superficie celular representa el primer paso y probablemente el más específico de la vía de señalización de IFN.

[0009] El receptor de IFN de Tipo I se compone de dos glicoproteínas transmembranales, las IFNAR1 e IFNAR2 (Uze et al., 1990; Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1995; y Domanski et al., 1995), en las que se produce a gran velocidad una fosforilación de tirosinas tras la unión con IFN (Platanias et al., 1994; Constantinescu et al., 1994; y Abramovich et al., 1994). Ambas subunidades pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas de Clase II (Bazan et al., 1990; y Thoreau et al., 1990) y son necesarias para efectuar la unión de ligandos de alta afinidad y establecer la actividad biológica (Langer et al., 1996; y Domanski et al., 1996). Los receptores de citoquinas de Clase II se diferencian de los de Clase I por el patrón de pares de residuos de cisteína conservados que se considera que forman los enlaces disulfuro.

[0010] El receptor de IFN de Tipo II (IFN γ) consta de dos glicoproteínas transmembranales, las IFNGR1 e IFNGR2, que se encuentran pre-unidas en la superficie celular. Cuando el IFN se une con su receptor, se activan las tirosinas quinasas Jak1 y Jak2, se produce la fosforilación de tirosinas y se forma el homodímero Stat1. Este homodímero activado se transloca al núcleo y allí se une a la secuencia GAS (secuencia activada por interferón gamma), lo que produce la activación transcripcional de los genes activados por IFN.

[0011] Los interferones de Tipo III se unen a un único receptor que comprende el IL-28R α , específico para encadenar los IFN λ , y la cadena del IL-10R β , que también forma parte de los receptores para los IL-10, IL-22 e IL-26 (Ank et al., 2006).

[0012] A diferencia de otros receptores de citoquinas, y comparando en especial con el receptor de IFN γ , la unión individual de los IFNAR1 e IFNAR2 al IFN α o IFN β no alcanza la afinidad de unión del heterodímero. A pesar de que el IFNAR2 desempeña un papel fundamental en la unión de los ligandos, el IFNAR1 contribuye a la unión del IFN aumentando la afinidad del complejo receptor (entre 4 y 10 veces) en relación con la afinidad correspondiente a la unión individual del IFNAR2. Asimismo, el IFNAR1 modula también la especificidad de la unión de los ligandos con respecto a la unión individual del IFNAR2 observada. (Cohen et al., 1995; Russell-Harde et al., 1995; Cutrone et al., 1997; y Cook et al., 1996). El dominio extracelular del IFNAR1 es mayor que el de la mayoría de los receptores de citoquinas de Clase II. Consta de 4 subdominios semejantes a inmunoglobulina separados por motivos de di- o tri- prolina, que se pueden dividir en dos repeticiones en tándem (Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1992; y Uze et al., 1995).

[0013] El IFNAR1 humano, murino y bovino han sido clonados y expresados en células humanas y murinas. Los estudios realizados con células transfectadas muestran que el IFNAR1 desempeña un papel fundamental en la unión de los ligandos, en las respuestas celulares a los IFN y en la inducción de las actividades biológicas de los interferones de Tipo I (Novick et al., 1994; Abramovich et al., 1994; Uze et al., 1992; Mouchel-Vielh et al., 1992; Lim et al., 1993; Cleary et al., 1994; Constantinescu et al., 1995; Hwang et al., 1995; Vandenbroek et al., 1995; y Colamonici et al., 1994). El receptor de IFN también determina el alto grado de especificidad de las especies característico de los IFN. Así, la transfección de células de ratón con IFNAR1 e IFNAR2 hace dichas células sensibles a los IFN humanos de Tipo I, dado que ambas células (humanas y de ratón) comparten una vía de señalización y tienen elementos receptivos al IFN comunes en las regiones promotoras de los genes regulados por el IFN. Además, se ha demostrado que el dominio intracelular del IFNAR1 desempeña un papel clave en la transducción de la señal que se inicia en la superficie celular hacia el núcleo tras la unión de interferones de Tipo I (Basu et al., 1998). La interrupción dirigida del gen IFNAR1 provoca la pérdida de la respuesta antiviral a los IFN de Tipo I, lo que demuestra que este polipéptido del receptor es un componente esencial del complejo receptor y que ambas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2) resultan necesarias para la señalización de IFN α e IFN β (Vandenbroek et al., 1995; Muller et al., 1994; Fiette et al., 1995; Steinhoff et al., 1995; y van den Broek et al., 1995).

[0014] La unión del interferón de Tipo I al complejo receptor activa dos quinasas Janus (Tyk2 y JAK1) que median en la fosforilación de tirosinas y la activación de los dos factores de transcripción citoplasmáticos latentes STAT1 y STAT2. Estos factores forman un complejo (ISGF3) con la proteína p48 de unión a ADN, la proteína 9 estimulada por el interferón (IRF 9), que se transloca al núcleo para promover la transcripción de genes específicos (Fu et al.,

1992; Schindler et al., 1992; Darnell et al., 1994; Ihle et al., 1995; y Taniguchi, 1995). Los Tyk2 y STAT2 están asociados constitutivamente con la región próxima a la membrana de la cadena del IFNAR1, mientras que los JAK1 y STAT1 están asociados físicamente con el IFNAR2. Los cuatro factores se activan rápidamente durante la estimulación de IFNcc (Lutfalla et al., 1995; Bazan, 1990; Basu et al., 1998; Barbieri et al., 1994; Velazquez et al., 1995; Uddin et al., 1995; Yan et al., 1996(a) y 1996(b).

[0015] La unión de los IFN de Tipo III con sus correspondientes receptores de la superficie celular activa también el complejo ISGF3, lo que sugiere que los IFN de Tipo III activan también a una serie de genes comunes con los IFN de Tipo I (Ank et al., 2006).

Receptores de reconocimiento de patrones

[0016] Poblaciones clave de células, incluidas las células dendríticas (DC), que están distribuidas por todos los tejidos periféricos, actúan como centinelas capaces de reconocer a agentes infecciosos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos incluyen la familia de receptores tipo Toll (TLR) de los receptores de la superficie celular y de la membrana endosomal (Uematsu y Akira, 2007), y las proteínas receptoras citosólicas del tipo de gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) RIG-1, MDA5 y LGP2 (Yoneyama y Fujita, 2007). Se han identificado trece miembros de la familia TLR en los mamíferos (Uematsu y Akira, 2007). Cada TLR media en una respuesta distinta cuando se asocia con combinaciones diferentes de las cuatro proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR (receptor Toll/IL-1): MyD88, TRIF, TIRAP/MAL y TRAM. Todos los TLR interactúan con la MyD88, a excepción del TLR3. El TLR3, que reconoce el ARN viral mono o bicatenario, se localiza en los endosomas de las DC mieloides y precisa de la acidificación de las vesículas para activarse. El TLR3 emite señales a través de la TRIF y activa a TBK1/IKKε, que fosforila el factor de regulación del interferón 3 (IRF3) y el NFκB, resultando en la producción de IFN β (Hemmi et al., 2004; y Perry et al., 2004). Las proteínas receptoras tipo RIG-I son helicasas de ARN con cuadro DExD/H, dos de las cuales (RIG-I y MDA5) disponen de motivos tipo CARD (dominio de reclutamiento y activación de caspasas) en el extremo N-terminal (Yoneyama y Fujita, 2007). El dominio CARD interactúa con IPS-1 produciendo la activación de IRF3 y NFκB, así como la producción de IFN β. Así, la activación de los PRR promueve la producción de citoquinas proinflamatorias, incluidos los IFN de Tipo I, y la activación de la respuesta inmunitaria innata.

[0017] Las células dendríticas emiten sus señales principalmente a través de los TLR, mientras que los receptores tipo RIG-I predominan en otros tipos de células. En los humanos se pueden distinguir dos subconjuntos principales de las células DC compuestos de las DC mieloides derivadas de monocitos CD11c(+), presentes en la mayoría de tejidos, y las DC plasmacitoides CD11c(-) (pDCs), presentes fundamentalmente en los ganglios linfáticos. Las DC plasmacitoides son las principales productoras de IFN de Tipo I en respuesta a virus (Steinmann y Hemmi, 2006). Estas células expresan altos niveles de TLR9 y TLR7/8, que reconocen el ARN monocatenario (ssRNA) y el ADN CpG respectivamente (Diebold et al., 2004; Heli et al., 2004; y Hemmi et al., 2000). La activación de TLR7/8 y TLR9 conduce a la formación de un complejo con MyD88 y la fosforilación de IRF7, y a la producción de altos niveles de IFN de Tipo I (Uematsu y Akira, 2007).

Receptores de TNF

[0018] El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citoquina multifuncional que ejerce efectos pleiotrópicos en distintos tipos de células. El TNF-α se sintetiza como pro-TNF, una proteína 26 kDa unida a la membrana, que se libera cuando la enzima convertidora de TNF (TACE) fragmenta su prodominio para producir una proteína 17 kDa compuesta por 157 aminoácidos, que existe como homotrímero disuelto. Los TNF-α se unen a dos receptores distintos, el TNFR-1 (p55) y el TNFR2 (p75). El TNFR-1 (p55) contiene un dominio de muerte (ausente en el TNFR2) que interviene en la inducción de la apoptosis. La unión del homotrímero TNF-α al TNFR-1 produce la trimerización del TNFR-1 y la liberación del silenciador del dominio de muerte (SODD). El dominio de muerte asociado al TNFR (TRADD) se une al dominio de muerte del TNFR-1 y recluta las proteínas adaptadoras, la proteína de interacción con el receptor (RIP), el factor 2 asociado al TNFR (TRAF-2), y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). El TNFR-1 señala la apoptosis con la unión del FADD a la pro-caspasa 8, la activación de la cual induce una cascada de proteasas que provoca la apoptosis. El TNFR-1 señala la supervivencia, con el reclutamiento del TRAF-2, que inhibe la apoptosis a través de la proteína citoplasmática inhibidora de la apoptosis (ciAP). Una de las principales vías de señalización desencadenada por el reclutamiento del TRAF-2 y de la RIP al complejo receptor TNFR-1 es la vía NF-κB, que transduce una señal al núcleo que culmina con la activación transcripcional de una serie de genes TNF diana (Schwamborn et al., 2003). El NF-κB es un factor de transcripción ubicuo inducido por varias citoquinas (incluyendo las IFNγ, IL2, IL5 e IFNα2). El NF-κB interviene en la regulación de numerosos genes relacionados con procesos como la respuesta inflamatoria, la apoptosis, el cáncer, la supervivencia neuronal y la inmunidad innata. La activación del NFκB se controla principalmente en el nivel postranscripcional, con la degradación de la subunidad inhibitoria IκB del complejo p55/p65/IκB, presente en el citoplasma. Estímulos de activación como el TNFα activan un complejo quinasa compuesto por dos quinasas IκB específicas (IKKα e IKKβ), y una subunidad moduladora (NEMO o IKKγ). Este proceso conduce a la fosforilación de la subunidad inhibitoria, a su ubiquitinación y a su degradación a través del proteasoma. Así se desencadena la translocación del NF-κB al núcleo, donde inicia la transcripción uniéndose a las secuencias de regulación (secuencias de reconocimiento/unión del NFκB) presentes en la región promotora de los genes NFκB diana.

Receptores acoplados a proteínas G

5 [0019] Las vías de señalización transmembranales de la proteína G constan de 3 proteínas: receptores, proteínas G y efectores. Las proteínas G actúan de intermediarias en las vías de señalización transmembranales y son heterodímeros compuestos por las subunidades α , β y γ . Entre los miembros de una familia de proteínas G difieren las subunidades α . Las funciones de estas proteínas se regulan por la asociación cíclica del GTP con la subunidad α , seguida por la hidrólisis del GTP al GDP y la disociación del GDP.

10 [0020] Los receptores acoplados a proteínas G son una clase diversa de receptores que media en la transducción de señal uniéndose a las proteínas G. La transducción de señal se inicia con la unión de los ligandos al receptor de la membrana celular, que estimula la unión del receptor a la proteína G. La interacción entre la proteína G y el receptor libera GDP, que se une de manera específica a la proteína G y posibilita la unión del GTP, lo cual activa la proteína G. Una vez activada, la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora que regula los niveles intracelulares de segundos mensajeros específicos. Entre estas proteínas efectoras se encuentran la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa y la fosfolipasa C.

Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento

20 [0021] Los factores de crecimiento de polipéptidos son moduladores de la proliferación y diferenciación celular. Sus funciones biológicas son mediadas por la interacción del factor de crecimiento con los receptores de la superficie celular y las subsiguientes alteraciones en la expresión de los genes. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos, y parece que inducen la fosforilación de tirosinas y la síntesis del mRNA de c-fos. Además, por lo menos algunos factores de crecimiento se translocan al núcleo, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Yeh et al., 1987) y el factor 2 de crecimiento de unión a heparina o factor básico de crecimiento de fibroblastos (Bouche et al., 1987).

25 [0022] La activación de receptores de factores de crecimiento por la interacción con factores específicos de crecimiento o agentes como el acetato de forbol miristato (PMA), activa la proteína quinasa C, una familia de proteínas quinasas activadas por fosfolípidos y calcio. Esta activación da lugar a la transcripción de una serie de genes de codificación de factores de transcripción, los protooncogenes (como c-fos, c-myc y c-jun), proteasas, inhibidores de proteasa (como la colagenasa de Tipo I y el inhibidor del activador del plasminógeno) y moléculas de adhesión (como la molécula de adhesión intercelular I). La activación de la proteína quinasa C antagoniza la actividad de los factores de crecimiento debido a la rápida fosforilación de los receptores de factores de crecimiento, lo cual a su vez reduce la actividad de la tirosina quinasa. Se considera que los factores de crecimiento y otros mitógenos que inducen la proliferación y el crecimiento celular desempeñan un papel central en el crecimiento de tumores, los cuales con frecuencia llevan receptores de la superficie celular identificables que son específicos de factores de crecimiento y otras señales extracelulares.

30 [0023] La interacción del factor de crecimiento nervioso (NGF) con su receptor es típica de la cantidad de respuestas que generan las señales extracelulares de este tipo. El NGF es una hormona de crecimiento polipeptídica necesaria para la diferenciación y el crecimiento de las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural. El NGF se une a su correspondiente receptor de la superficie celular, y se transporta de forma retrógrada al cuerpo de la célula (Changelian et al., 1989). Eso inicia una cascada de eventos intracelulares que culminan con un fenotipo diferenciado. En el estudio de la diferenciación mediada por NGF se usan como modelo las células PC12, una línea celular de feocromocitoma de rata. Tras el tratamiento con NGF, las células PC12 cambian de células tipo cromafines suprarrenales que se replican a células tipo neuronas simpáticas eléctricamente excitables que no se replican.

35 [0024] Los cambios fenotípicos se acompañan por la inducción y la expresión de genes específicos. La unión de NGF a las células PC12 induce la expresión rápida e inmediata de genes específicos, incluidos los genes c-fos, NGF1-A y NGF1-B, también denominados genes tempranos. Se considera que dichos genes codifican los reguladores transcripcionales. El producto génico de NGF1-A contiene dominios "dedo de zinc" que se repiten en tándem, característicos de las proteínas de unión a ADN, y la proteína NGF1-B es homóloga a los miembros de la familia de receptores de glucocorticoides, por lo que es probable que funcione como un modulador de transcripción dependiente de ligandos. El producto génico de c-fos, FOS, parece funcionar como una molécula de regulación transcripcional.

El gen c-fos y genes relacionados

40 [0025] Tal como se ha indicado anteriormente, la inducción de la expresión del gen c-fos es un evento común en varias vías de respuesta que se inician por la actividad de una variedad de proteínas de la superficie celular.

45 [0026] El producto génico de c-fos, FOS, se asocia con el activador de la transcripción JUN (producto del gen c-jun) para formar un complejo que a su vez forma un complejo de activación de la transcripción, el AP-1. La transcripción de c-fos y c-jun se induce rápida y transitoriamente tras la estimulación. Los mRNA inducidos se acumulan durante

1-2 horas en el citoplasma, donde se trasladan las proteínas FOS y JUN, de vida corta, para translocarse luego al núcleo y formar un complejo proteico heterodimérico que se une al elemento de regulación del ADN, el sitio de unión del AP-1.

5 [0027] Los genes c-fos y c-jun son miembros de las familias génicas que codifican proteínas que participan en la formación de los complejos heterodiméricos que interactúan con los sitios de unión del AP-1. El factor de transcripción AP-1 está compuesto por varios complejos proteicos cuyas concentraciones se alteran frente a la estimulación celular. Estos complejos interactúan de manera específica con un motivo de secuencia núcleo de nucleótidos con siete bases, que es conocido como un constituyente relativamente común de elementos de regulación transcripcional tanto positivos como negativos, y es necesario con respecto a los niveles basales e inducidos de la expresión de los genes.

10 [0028] Los productos génicos FOS y JUN cooperan en la regulación de los genes diana inherentes a muchas de las respuestas celulares y adaptativas al entorno. Forman parte de una serie de procesos neurofisiológicos.

15 [0029] De esta manera, la inducción de c-fos involucra varias vías de segundos mensajeros que actúan a través de distintos elementos de regulación y que modifican diferencialmente el producto génico resultante, FOS, que a su vez interactúa de distintos modos con la proteína JUN modificada diferencialmente. Por lo tanto, una multitud de eventos extracelulares induce la expresión de un pequeño número de proteínas inducibles, que forman una serie de complejos proteicos capaces de unirse diferencialmente a los elementos de regulación del ADN que contienen los sitios de unión del AP-1. En consecuencia, una gran cantidad de proteínas de la superficie celular pueden actuar a través de vías de transducción superpuestas y transducir las señales extracelulares que finalmente inducen una variedad de respuestas.

20 [0030] Son muchos los ensayos basados en la actividad in vivo de una línea celular viva. Puede servir de ejemplo una línea celular con un elemento de respuesta al estímulo del interferón (ISRE) con conexión a un gen de la luciferasa, o a otro gen reportero. En este supuesto, si la línea celular se expone a la presencia de interferón como una señal extracelular, la actividad de transducción de señal de los receptores de la superficie celular de interferón endógeno produce una señal que activa el ISRE, lo que a su vez provoca la transcripción del gen de la luciferasa. De esta manera, es posible medir la actividad generadora de luz de la luciferasa y relacionarla con la cantidad de interferón presente en la muestra, la cual es proporcional a la cantidad de interferón en un rango determinado (Lallemand et al., 1996).

25 [0031] Leonart et al. (1990) describieron un ensayo con genes reporteros para el interferón de Tipo I basado en células Vero de mono transfectadas con un promotor Mx de ratón inducible por interferón de Tipo I, vinculado al gen de la hormona del crecimiento humano (hGH) como gen reportero. Para ampliar este ensayo, se transfectaron las células Vero de mono con un plásmido que llevaba el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor Mx1 de ratón inducible por interferón de Tipo I (Canosi et al., 1996).

30 [0032] Hammerling et al. (1998) llevaron a cabo otro tipo de ensayo con genes reporteros para el interferón. En esta ocasión se recurrió a una línea celular de glioblastoma humano transfectada con una construcción de genes reporteros compuesta por un promotor de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y un gen reportero β -galactosidasa de *E. coli* (lacZ). Este ensayo concreto mide la reducción/inhibición de la expresión de β -galactosidasa por el interferón humano de Tipo I o II de manera selectiva y en función de la dosis.

35 [0033] Los resultados de muchos extensos estudios clínicos aleatorios muestran que el interferón beta (IFN β) reduce la frecuencia y la severidad de las recaídas clínicas, ralentiza la progresión de la enfermedad y mejora la calidad de vida de los pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente (RRMS) (Clerico et al., 2007; y McCormick et al., 2004). No obstante, el tratamiento repetido con IFN β recombinante puede bajar la tolerancia inmunitaria a los autoantígenos en determinados pacientes, desencadenando la producción de anticuerpos neutralizantes (NAB) contra el homólogo de la proteína recombinante (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). La aparición de anticuerpos NAB se asocia a una reducción tanto de la farmacodinámica (inducción de productos génicos receptivos a IFN β ; Deisenhammer et al., 2004) como de la respuesta clínica, lo cual se determina por imágenes por resonancia magnética (MRI) o la propia progresión de la enfermedad (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). La frecuencia y los títulos de los anticuerpos anti-IFN β varían en función del tipo del preparado de IFN β con que se trata al paciente, y de la frecuencia y vía de administración. Aunque es difícil realizar comparaciones directas entre muchos de los estudios realizados debido a la variedad de ensayos y estándares de neutralización que utilizan, estudios comparativos muestran que el IFN β -1b es más inmunogénico que el IFN β -1a (Bertolotto et al., 2002), debido posiblemente a la menor actividad específica del IFN β -1b y, por tanto, a la mayor masa proteica que se inyecta (Antonetti et al., 2002). También pueden contribuir a la inmunogenicidad del IFN β -1b las diferencias en los aminoácidos, la falta de glicosilación del IFN β -1b recombinante en comparación con la proteína nativa o las formas actualmente autorizadas del IFN β -1a, o las características de la formulación (Giovannoni, 2004).

40 [0034] Los métodos actuales para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el IFN α o IFN β se basan en la inhibición de la actividad del IFN a través de bioensayos antivirales o de la inducción de una proteína inducida por IFN (Deisenhammer et al., 2004). Los bioensayos basados en la capacidad del IFN para inhibir la

replicación viral son imprecisos, ya que se limitan a detectar diferencias del doble o más, ofrecen resultados variables y precisan de varios días para completarse. Para medir la inducción de una proteína antiviral inducida por IFN como MxA deben usarse líneas celulares o sangre periférica, y realizar una evaluación posterior de los niveles de proteína con ELISA o medir los niveles de mRNA de MxA (Deisenhammer et al., 2004).

5

[0035] El documento WO 2004/039990 A (TOVEY MICHAEL, 13-05-2004) divulga un ensayo con genes reporteros y un kit donde se usa una vía de transducción de señal de IFN. La vida útil de la línea celular que se emplea en este ensayo (así como en la invención presente), PIL5, aumenta con el uso de agentes antimitóticos o proapoptóticos y su posterior criopreservación.

10

Resumen de la invención

[0036] La presente invención ofrece un método para llevar a cabo un ensayo de neutralización, con el objetivo de determinar el título de los anticuerpos en una muestra que se somete a la prueba. Los anticuerpos de esta muestra son específicos bien para una molécula diana predeterminada, que activa la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular, o un receptor de reconocimiento de patrones o para un antagonista de la molécula diana predeterminada. Este método presenta una mejora respecto a los ensayos de neutralización existentes porque la sensibilidad del ensayo con genes reporteros para determinar la neutralización aumenta por el uso de una línea celular transformada con una construcción de genes reporteros. Asimismo, sus propiedades garantizan que se mantendrá la transducción de señal en respuesta a una señal extracelular que genera la molécula diana durante al menos una hora aproximadamente. No obstante, la actividad de transducción de señal se perderá y se incurrirá en muerte celular en un periodo no superior a 30 días aproximadamente a temperaturas por encima del punto de congelación.

15

20

25

Breve descripción de las figuras

[0037] La figura 1 muestra una representación esquemática de una construcción de genes reporteros de la luciferasa, donde la expresión de la luciferasa se controla por un promotor quimérico que contiene un elemento de respuesta sensible al interferón (ISRE) del gen ISG15 y un promotor SV40 mínimo.

30

[0038] La figura 2 muestra una representación esquemática de una construcción de genes reporteros de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP-1), donde la expresión de EGFP-1 se controla por un promotor quimérico que contiene un ISRE del gen ISG15 y un promotor SV40 mínimo.

35

[0039] La figura 3 es un gráfico de curvas dosis-respuesta para los subtipos de IFN α humano. Las células PIL5 vivas congeladas fueron incubadas durante la noche con diluciones seriadas al décimo (1:10) de uno de los subtipos de IFN alfa humano o IFN β . A continuación, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. La actividad de IFN se determinó a partir de la curva dosis-respuesta de unidades relativas de luciferasa (RLU), expresadas como coeficiente de inducción, respecto a la concentración de IFN expresada en IU/ml.

40

[0040] Las figuras 4A y 4B son gráficos de curvas dosis-respuesta para los interferones humanos de Tipo I. Las células PIL5 vivas fueron incubadas durante la noche con diluciones seriadas al décimo (1:10) de la preparación de referencia internacional del IFN α humano (G-023-901-527), tal como se muestra en la figura 4A, o de la preparación de referencia internacional del IFN β humano (Gb23-902-531), tal como se muestra en la figura 4B. A continuación, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. La actividad de IFN se determinó a partir de la curva dosis-respuesta de unidades relativas de luciferasa (RLU), expresada como razón de incremento de la inducción, respecto a la concentración de IFN expresada en IU/ml.

45

50

[0041] Las figuras 5A y 5B son gráficos de curvas dosis-respuesta para las preparaciones clínicamente formuladas de IFN α e IFN β humano. En la figura 5A, las células PIL5 congeladas y preparadas para el ensayo (ensayo de alfa y beta de iLite, NeutekBio Ltd, Galway, Irlanda), se sometieron a descongelación rápida y fueron incubadas durante la noche por duplicado con diluciones seriadas al décimo (1:10) de IFN α 2a (ROFERON-A™), IFN α 2b (INTRON-A™), IFN α 2a pegilado (PEGASYS™), o IFN α 2b pegilado (PEG-INTRON™) humano. En la figura 5B, las células PIL5 congeladas y preparadas para el ensayo (ensayo de alfa y beta de iLite, NeutekBio Ltd, Galway, Irlanda), se sometieron a descongelación rápida y fueron incubadas durante la noche por duplicado con diluciones seriadas al décimo (1:10) de IFN β -1a (AVONEX™), IFN β -1a (REBIF™), o IFN β -1b (BETA FERON™) humano. A continuación, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. La actividad de IFN se determinó a partir de la curva dosis-respuesta de unidades relativas de luciferasa (RLU), respecto a la concentración de IFN expresada en IU/ml.

55

60

[0042] Las figuras 6A a 6D son gráficos comparativos de curvas dosis-respuesta para los interferones humanos de Tipo I obtenidos usando células tratadas con químicos o células vivas. Las células PIL5 congeladas y preparadas

65

para el ensayo (círculo abierto) o las células PIL5 vivas (cuadrado sólido) fueron incubadas durante la noche por duplicado con diluciones seriadas al décimo (1:10) de INTRONA™ (fig. 6A), BETAIFERON™ (fig. 6B), REBIF™ (fig. 6C), o AVONEX™ (fig. 6D). A continuación, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. La actividad de IFN se determinó a partir de la curva dosis-respuesta de unidades relativas de luciferasa (RLU), expresadas como razón de incremento de la inducción, respecto a la concentración de IFN expresada en IU/ml.

[0043] Las figuras 7A a 7D son gráficos de curvas de neutralización para anticuerpos neutralizantes NAB de IFN α antihumano usando células PIL5 tratadas con químicos. Se incubaron por duplicado durante la noche diluciones seriadas al décimo (1:10) de sueros de pacientes con hepatitis C crónica tratados con IFN- α 2 recombinante, con 10 LU/ml de ROIFERON™ (fig. 7A), IFN α 1 (fig. 7B), PEGASYST™ (fig. 7C), o PEG-INTRON™ (fig. 7D) durante 1 hora a 37° C y, a continuación, durante 2 horas más a 4° C antes de incubarse durante la noche con células PIL5 congeladas y tratadas con vinblastina, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. Seguidamente, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS. Los títulos de NAB de las muestras se determinaron conforme al epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS y expresados en unidades TRU/ml.

[0044] Las figuras 8A a 8C son gráficos de curvas de neutralización para anticuerpos NAB de IFN β antihumano usando células PIL5 tratadas con químicos. Se incubaron por duplicado diluciones seriadas al décimo (1:10) de sueros de pacientes con RRMS tratados con IFN β recombinante, con 10 LU/ml de BETAIFERON™ (fig. 8A), REBIF™ (fig. 8B) o AVONEX™ (fig. 8C) durante 1 hora a 37° C y, a continuación, durante 2 horas más a 4° C antes de incubarse durante la noche con células PIL5 congeladas y tratadas con vinblastina, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. A continuación, las células fueron lisadas con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2. Los títulos de NAB de las muestras se determinaron conforme al epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS y expresados en unidades TRU/ml.

30 Descripción detallada de la invención

[0045] El objeto de la presente invención es un método mejorado de realización de un ensayo para determinar el título de los anticuerpos neutralizantes en una muestra que contiene anticuerpos específicos para una molécula diana predeterminada, i.e. que pueden reconocer y unirse a ella, la cual activa la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular o de un receptor de reconocimiento de patrones, y bloquea la capacidad de la molécula diana predeterminada para activar la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular o de un receptor de reconocimiento de patrones. Asimismo, la presente invención tiene como objeto un método mejorado para determinar el título de neutralización de los anticuerpos que reconocen moléculas o preparaciones, como vacunas bacterianas o virus atenuados o vivos, cuyos componentes interactúan con receptores de reconocimiento de patrones, que incluyen, entre otros, los receptores tipo Toll (TLR) de la superficie celular o receptores de la membrana endosomal (Uematsu y Akira, 2007), o las proteínas receptoras citosólicas del tipo de gen inducible por ácido retinoico 1 (GIG-1) RIG-1, MDA5 y LGP2 (Yoneyama y Fujitá, 2007). Además, con el presente método se puede determinar el título de los anticuerpos neutralizantes para los antagonistas de la molécula diana predeterminada.

[0046] El método de la presente invención conlleva la preparación de una dilución seriada de la muestra, preferentemente obtenida de la sangre (suero) de un sujeto mamífero, a la que se agrega una cantidad fija de la molécula diana (y una cantidad fija de un antagonista de la molécula diana si han de determinarse los anticuerpos neutralizantes para dicho antagonista). Dicha cantidad corresponde a una unidad predeterminada de actividad de la molécula diana, aplicando a las distintas diluciones la misma concentración de molécula diana. A continuación, las distintas diluciones se someten a un ensayo con genes reporteros para medir el nivel del producto del gen reportero cuando la dilución entra en contacto con una línea celular transformada con una construcción de genes reporteros. El objetivo es determinar, en primer lugar, la cantidad de actividad residual (capacidad de las moléculas diana restantes que no han sido neutralizadas por anticuerpos ni antagonistas de activar la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular o de un receptor de reconocimiento de patrones) de la molécula diana en la dilución, y en segundo lugar, determinar la dilución en la que la actividad de la molécula diana agregada se reduce en función de un factor predeterminado x , donde el título de neutralización de los anticuerpos se expresa como una reducción multiplicada por x en unidades de actividad/ml. Este factor predeterminado x es preferentemente 10, de modo que el título de los anticuerpos neutralizantes se expresa en unidades de reducción a la décima parte (TRU)/ml.

[0047] La mejora respecto a los ensayos de neutralización estándar convencionales consiste en que aumenta la sensibilidad del método del ensayo de neutralización según la presente invención debido al uso de una línea celular en el ensayo con genes reporteros tratada previamente con un agente antimitótico o proapoptótico, para adquirir la propiedad de mantener la actividad de transducción de señal durante al menos una hora, preferentemente al menos durante 8 horas aproximadamente y más preferentemente durante al menos dieciocho horas aproximadamente. No

obstante, perderá la actividad de transducción de señal e incurrirá en muerte celular (apoptosis) en no más de 30 días, preferentemente en no más de 14 días, más preferentemente en no más de 5 días incluso en no más de 24 horas, si se supera la temperatura de congelación.

5 [0048] Los inventores de la presente invención descubrieron inesperadamente que las células PIL5 (células promonocíticas humanas U937 transfectadas con una construcción de genes reporteros de la luciferasa bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN; Lallemand et al., 1996) tratadas con un agente antimetabólico o proapoptótico (i.e. vinblastina), para adquirir la propiedad de mantener la actividad de transducción de señal durante el tiempo suficiente para llevar a cabo el ensayo de neutralización, y perder la actividad de transducción de señal e
10 incurrir en muerte celular en no más de 30 días si se supera la temperatura de congelación, se comportan mejor con una sensibilidad mejorada del ensayo de neutralización en comparación con las correspondientes células no tratadas. Dado que las células "tratadas" no pueden replicarse, no se consideran células "vivas" como las células PIL5 no tratadas.

15 [0049] La línea celular usada en el método según la presente invención, cuya línea celular PIL5 es una realización preferida, fue revelada con anterioridad en los documentos WO 2004/039990 y US 2004/0235157, ambos incluidos en el presente documento como referencia. La línea celular revelada en WO 2004/039990 y US 2004/0235157 se transforma con una construcción de genes reporteros que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto del gen reportero unido operativamente a uno o varios elementos de control transcripcional. Se regula a
20 través de la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular en respuesta a una señal extracelular (i.e. se genera por la molécula diana usada en el método según la presente invención). Esta célula se ha tratado de tal manera que mantenga la actividad de transducción de señal de la proteína de la superficie celular durante al menos una hora pero no más de 30 días, si se supera la temperatura de congelación, antes de perder dicha actividad. No se trata simplemente de inhibir la división celular y mantener la célula en estado de congelación para proporcionarle la vida útil necesaria para el objetivo deseado por el usuario final (p. ej. realizar un ensayo), sino
25 en aplicar a la célula el tratamiento necesario para congelarla y posibilitar periodos prolongados de almacenamiento y transporte en este estado. De este modo, se ofrece a los proveedores la ventaja comercial de disponer de células de un solo uso que el usuario no puede propagar para otras aplicaciones. En su lugar, debe adquirirse del proveedor una célula, preferentemente integrada en un kit, para cada uso.

30 [0050] Si se compara la actividad de los genes reporteros de las células "tratadas" y "vivas" con distintos títulos de interferón (tal como se muestra en el ejemplo 2 siguiente), puede apreciarse que el coeficiente de aumento de la actividad de los genes reporteros de los títulos bajos de interferón para las células tratadas resulta significativamente más elevado que para las células vivas. Por otra parte, las células vivas presentan mayor receptividad a títulos más
35 altos de interferón. Así, las células tratadas presentan un límite inferior de detección de interferón y una sensibilidad mejor al interferón. La sensibilidad se define como el punto medio de la curva dosis-respuesta de interferón, determinado por la diferencia entre el valor obtenido para la muestra de control sin interferón y el valor obtenido para las dosis de saturación de interferón.

40 [0051] La importancia de esta actividad mejorada con títulos de interferón inferiores radica en que las células tratadas son muy superiores a las células vivas en la cuantificación de anticuerpos neutralizantes contra al interferón. Este hecho puede apreciarse especialmente en el caso de antiseros potentes, donde de forma sistemática se obtienen títulos de neutralización más altos con células tratadas que con células vivas. La metodología estándar aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kawade et al., 1984; y Grossberg
45 et al., 2001a, b) para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero (por ejemplo, en el suero de pacientes con esclerosis múltiple recurrente tratados con interferón β), es la siguiente: el ensayo determina la capacidad de las diluciones seriadas del suero de un paciente para reducir diez unidades de actividad de laboratorio a una unidad de actividad de laboratorio, lo que se considera el punto final. El título de los anticuerpos neutralizantes se expresa en unidades de reducción a la décima parte por ml (TRU/ml).

50 [0052] La enorme importancia clínica de los ensayos con anticuerpos neutralizantes radica en que los pacientes de enfermedades crónicas que reciben tratamiento continuado, como en el caso de la esclerosis múltiple remitente recurrente tratada con interferón β , dejan de experimentar los efectos beneficiosos del tratamiento con el agente terapéutico si el paciente desarrolla una respuesta inmunitaria contra dicho agente. Por ello es importante poder
55 detectar si un paciente desarrolla este tipo de respuesta y cuándo esto ocurre, para detener el tratamiento en este momento. De este modo pueden evitarse posibles reacciones adversas como un shock anafiláctico o reacciones a la perfusión.

60 [0053] La sensibilidad mejorada a títulos inferiores de interferón ofrece dos ventajas. En primer lugar, se puede hablar de mejora en el sentido de que se reduce el límite inferior de detección. Al reducir este límite, pueden detectarse en el ensayo cantidades menores de interferón, y esto puede resultar muy útil para distintos propósitos.

[0054] La segunda ventaja inherente al método de ensayo de neutralización según la presente invención consiste en la obtención de resultados más precisos y sensibles, especialmente en el caso de pacientes con niveles elevados de anticuerpos anti-interferón circulantes. En el ensayo de neutralización aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) solo se determina una unidad de laboratorio como punto medio entre la respuesta máxima y mínima de
65

los genes reporteros. En el caso de títulos altos de interferón, la respuesta se estabiliza. Como puede apreciarse en los resultados experimentales y las figuras del ejemplo 2 siguiente, si se usan células vivas en lugar de células tratadas, se requiere una cantidad significativamente mayor de interferón, con una potencia aproximada superior a 10, para obtener una unidad de actividad de laboratorio. La curva de las células tratadas se desplaza
 5 manifestamente hacia la izquierda, lo que indica que se precisa una cantidad mucho menor de interferón para obtener una sola unidad de laboratorio. La conclusión siguiente es evidente: en las células tratadas (en comparación con las células vivas), diez unidades de laboratorio también tendrán títulos más bajos de interferón en la potencia de 10. Dado que en el ensayo se neutralizan cantidades mucho menores de anticuerpos, también se precisan menores cantidades de anticuerpos para realizar la neutralización, y puede determinarse con mayor precisión la cantidad de anticuerpos necesaria para neutralizar el 90% del interferón. Así se pueden determinar con mayor precisión los
 10 títulos de los anticuerpos y, en particular, de los títulos altos.

[0055] La muestra sometida a ensayo con el método según la presente invención es un fluido biológico de un sujeto mamífero, preferentemente de un sujeto humano, que contiene anticuerpos, como la sangre. De manera preferente, la muestra es suero.
 15

[0056] La línea celular a usar en el presente método puede ser de un sujeto mamífero o aviar, preferentemente siendo preferentes las células humanas. Las líneas celulares preferidas incluyen, entre otras, las líneas celulares humanas promonocíticas (o U937), mieloides (o U266R), de linfoma de células T (i.e. Jurkatt) y de adenocarcinoma de mama (o MCF7), y las líneas celulares de eritroleucemia o linfoma de ratón (o L120).
 20

[0057] La molécula diana predeterminada (o su antagonista), para la que se determina el título de los anticuerpos neutralizantes correspondientes según el método de la presente invención, está concebida para incluir cualquier agente terapéutico, tal como las proteínas terapéuticas, que active (o bloquee, en el caso de los antagonistas de la molécula diana) la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular, y para el que no se desea que se generen anticuerpos neutralizantes en el sujeto mamífero tratado con dicho agente. La molécula diana predeterminada también puede englobar componentes de moléculas o preparaciones, como vacunas bacterianas o virus atenuados o vivos, cuyos componentes interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de molécula diana incluyen el interferón- α , el interferón- β , el interferón- γ , la eritropoyetina (EPO), el TNF α , las interleucinas, la hormona del crecimiento, las gonadotropinas, la insulina y otras hormonas, y los factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) y granulocitos macrófagos (GM-CSF). Algunos ejemplos no limitativos de antagonistas de la molécula diana predeterminada, a los que se unen los anticuerpos neutralizantes, incluyen los antagonistas de TNF α , como el Infliximab (un anticuerpo quimérico), el Adalimumab (un anticuerpo completamente humano) y el Etanercept (una proteína de fusión de IgG1Fc del receptor TNFp75).
 25
 30
 35

[0058] La proteína de la superficie celular cuya actividad de transducción de señal, en respuesta a una señal extracelular de una proteína o un agente terapéutico, regula la expresión de un producto del gen reportero, puede ser cualquier proteína de la superficie celular conocida o identificable por expertos en la materia. Ejemplos no limitativos de estas proteínas de la superficie celular incluyen los receptores de la superficie celular y los canales iónicos. Algunos ejemplos no limitativos de los receptores de la superficie celular incluyen los receptores de citoquinas (p. ej. los receptores para el interferón de Tipo I y II, las interleucinas, la hormona del crecimiento, la eritropoyetina [EPO], los factores estimulantes de colonias de granulocitos [G-CSF] y granulocitos macrófagos [GM-CSF], los factores TNF α y TGF β , el ligando de Fas, el factor inhibitorio de leucemia [LIF], el factor neurotrófico ciliar [CNTF], etc.), los receptores de factores de crecimiento, de hormonas, de células T, de antígenos y los receptores complementarios y los neurorreceptores. El texto de referencia de J. M. Cruse y Robert E. Lewis (Atlas of Immunology, CRC Press, Washington, DC, 1999), que revela muchos de los receptores involucrados en las interacciones de la respuesta y el sistema inmunitario, se incorpora en su totalidad a este documento como referencia. Entre los receptores de la superficie celular se incluyen también los receptores muscarínicos (p. ej. el M2 humano [n.º de accesoión de GenBank M16404], el M3 de rata [n.º de accesoión de GenBank M16407], el M4 humano [n.º de accesoión de GenBank M16405], el M5 humano [Bonner et al., 1988] y similares), los receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina (p. ej. los subtipos $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 2$), la subunidad $\alpha 2$ de rata [Wada et al., 1988], la subunidad $\alpha 3$ de rata [Boulter et al., 1986], la subunidad $\alpha 4$ de rata [Goldman et al., 1987], la subunidad $\alpha 5$ de rata [Boulter et al., 1990], la subunidad $\beta 2$ de rata [Deneris et al., 1988], la subunidad de rata $\beta 3$ [Deneris et al., 1989], la subunidad $\beta 4$ de rata [Duvoisin et al., 1989], combinaciones de las subunidades α , de las subunidades β y de las subunidades α y β de rata, los receptores de GABA (p. ej. las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ bovinas [Schofield et al., 1987], las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ bovinas [Levitan et al., 1988], la subunidad γ [Pritchett et al., 1989], las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ [Ymer et al., 1989], la subunidad δ [Shivers, B.D., 1989] y similares), los receptores de glutamato (p. ej. el receptor aislado en el cerebro de rata [Hollmann et al., 1989] y similares), los receptores adrenérgicos (p. ej. el $\beta 1$ humano [Frielle et al., 1987], el $\alpha 2$ humano [Kobilka et al., 1987], el $\beta 2$ de hámster [Dixon et al., 1986] y similares), los receptores de dopamina (p. ej. el D2 humano [Stormann et al., 1990], de rata [Bunzow et al., 1988] y similares), los receptores de NGF (p. ej. los receptores de NGF humanos [Johnson et al., 1986] y similares) y los receptores de serotonina (p. ej. el 5HT1a humano [Kobilka et al., 1987], el 5HT2 de rata [Julius et al., 1990], el 5HT1c de rata [Julius et al., 1988] y similares).
 40
 45
 50
 55
 60
 65

[0059] Entre los receptores de reconocimiento de patrones cuya actividad de transducción de señal, en respuesta a

una señal extracelular de uno o varios componentes de una molécula o una preparación, como una vacuna bacteriana o un virus atenuado o vivo, regula la expresión de un producto del gen reportero, se incluyen los receptores de la superficie celular tipo Toll (TLR) o de la membrana endosomal (Uematsu y Akira, 2007) o las proteínas receptoras citosólicas del tipo gen inducible por ácido retinóico 1 (GIG-I) RIG-I, MDA5 y LGP2 (Yoneyama y Fujita, 2007), que reconocen o interactúan con los componentes de vacunas bacterianas o virus atenuados o vivos. Para determinar el grado de protección que ofrece la vacunación, es importante evaluar los anticuerpos neutralizantes generados en el sujeto mamífero que ha sido tratado con la vacuna.

[0060] En mamíferos, se han identificado trece miembros de la familia TLR (Uematsu y Akira, 2007). Cada uno de ellos media en una respuesta distinta cuando se asocia con combinaciones diferentes de las cuatro proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR (receptor Toll/IL-1): MyD88, TRIF, TIRAP/MAL y TRAM. Todos los TLR interactúan con la MyD88, a excepción de TLR3. El TLR3, que reconoce el ARN viral mono o bicatenario, se localiza en los endosomas de las DC mieloides y precisa de la acidificación de las vesículas para activarse. El TLR3 emite señales a través de TRIF y activa a TBK1/IKK ϵ , que fosforila el factor de regulación del interferón 3 (IRF3) y NF κ B, resultando en la producción de IFN β (Hemmi et al, 2004; y Perry et al., 2004). Las proteínas receptoras tipo RIG-I son helicasas de ARN con cuadro DExD/H, dos de las cuales (RIG-I y MDA5) proporcionan la activación de caspasas.

[0061] Entre los canales iónicos se incluyen los canales iónicos de calcio (p. ej. la subunidad neuronal α 2 humana [ver W089/09834], la subunidad α 1 de músculo esquelético de conejo [Tanabe et al. 1987], la subunidad α 2 de músculo esquelético de conejo [Ellis et al., 1988], la subunidad β de músculo esquelético de conejo [Ruth et al., 1989], la subunidad γ de músculo esquelético de conejo [Jay et al., 1990] y similares), los canales iónicos de potasio (p. ej. el cerebro de rata [BK2] [McKinnon, D., 1989], el cerebro de ratón [BK1] [Tempel et al., 1988] y similares), los canales iónicos de sodio (p. ej. el cerebro de rata Tipo I y II [Noda et al., 1986], el cerebro de rata Tipo III [Kayano et al., 1988] y similares).

[0062] Los expertos en la materia apreciarán que el receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular descritos anteriormente deban ser preferentemente endógenos a la célula de la presente invención. No obstante, apreciarán también que el receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular puedan expresarse a partir de ADN clonado, como complemento a los distintos receptores de reconocimiento de patrones o proteínas de la superficie celular. Asimismo, tanto el receptor de reconocimiento de patrones como la proteína de la superficie celular pueden expresarse a partir de ADN clonado, aunque se trate de elementos heterólogos a la célula huésped.

[0063] En cuanto a la transducción de señal, la señal intracelular que se va a transducir se inicia a través de la interacción específica de una señal extracelular, p.ej. una molécula o un cambio en el entorno, con un receptor o un canal iónico presentes en la superficie celular. Esta interacción desencadena una cascada de eventos intracelulares, cuya última consecuencia es un cambio rápido y detectable en la expresión de un producto génico, lo cual en la célula de la presente invención es un producto del gen reportero. Las señales extracelulares o moléculas efectoras son cualquier compuesto o sustancia que modifique de forma específica la actividad de los receptores de reconocimiento de patrones o las proteínas de la superficie celular. Entre estas señales se incluyen moléculas como las citoquinas (p. ej. los interferones), los factores de crecimiento, las hormonas, las endorfinas, los neurotransmisores, la acetilcolina y sustancias mitogénicas, como el acetato de forbol miristato (PMA) que se unen a los canales iónicos y los receptores de la superficie celular y modulan su actividad. Otros ejemplos incluyen componentes de las vacunas bacterianas y los virus atenuados o vivos.

[0064] La construcción de genes reporteros que transporta la célula usada en el método según la presente invención, consiste en una molécula de ADN que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un producto del gen reportero unido operativamente a secuencias o elementos de control transcripcional. Estas secuencias son las responsables de controlar la transcripción del gen reportero. El receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular regula, de forma directa o indirecta, la actividad de al menos una o de varias de estas secuencias de control. Entre las secuencias de control transcripcional se incluyen los promotores y otras regiones reguladoras, como las secuencias intensificadoras y los sitios de unión de activador y represor que modulan la actividad del promotor, o las secuencias de control que modulan la actividad o la eficacia de la ARN polimerasa que reconoce al promotor, o las secuencias de control que son reconocidas por las moléculas efectoras, incluidas aquellas inducidas específicamente por la interacción de una señal extracelular con un receptor de reconocimiento de patrones o una proteína de la superficie celular. Por ejemplo, para modular la actividad del promotor, puede modificarse la unión de la ARN polimerasa con la región del promotor, o alternativamente, puede interferirse en el inicio de la transcripción o en la elongación del mRNA. A estas secuencias se les denomina genéricamente en este documento como secuencias o elementos de control transcripcional. Además, la construcción puede contener secuencias de nucleótidos que modifiquen la traducción del mRNA resultante y, por lo tanto, alteren la cantidad expresada de producto del gen reportero.

[0065] Si la actividad de un receptor de reconocimiento de patrones o de una célula de la superficie celular regula un promotor o media en ello, la actividad de este promotor se modificará cuando una célula se exponga a una señal extracelular particular debido a la presencia de la proteína o el receptor mencionado, cuyas actividades resultarán también afectadas por la señal extracelular. Por ejemplo, el promotor de c-fos se activa específicamente cuando se

produce la interacción específica de ciertas señales extracelulares, como las hormonas de crecimiento, con una proteína de la superficie celular, como un receptor de estas hormonas. En particular, la regulación de estos promotores a través de la proteína de la superficie celular se produce, aunque de forma indirecta, en el espacio de unos minutos a partir del momento en que tiene lugar la interacción entre la señal extracelular y dicha proteína. Tal como describe el presente documento, la vinculación operativa hace referencia a la vinculación de un elemento de control transcripcional, i.e. un promotor, con una secuencia de codificación de nucleótidos, de modo que este elemento se posiciona de forma adecuada para desempeñar su actividad, consistente en unir la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de la secuencia de codificación de nucleótidos. Así, una secuencia de codificación de nucleótidos en vinculación operativa con un promotor se sitúa en sentido descendente respecto a la dirección de la transcripción desde el promotor, está en el marco de lectura correcto respecto al sitio de inicio de la transcripción, y se inserta de modo que la elongación de la transcripción proceda a través de la secuencia de codificación de nucleótidos.

[0066] Los elementos de control transcripcional adecuados pueden obtenerse o derivarse de las regiones reguladoras transcripcionales de los genes cuya expresión se induce de forma rápida, por lo general en tan solo unos minutos a partir del momento en que se produce el contacto entre el receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular, y la proteína efectora que modula la actividad del receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular. Entre estos genes se incluyen los genes inmediatos tempranos (Sheng et al., 1990), por ejemplo c-fos. Estos genes se inducen rápidamente cuando un ligando se une a una proteína de la superficie celular. Entre los elementos de control transcripcional preferidos para las construcciones de genes reporteros se encuentran los correspondientes a los genes inmediatos tempranos, los elementos derivados de otros genes que presentan parcial o completamente las características de los genes inmediatos tempranos, o elementos sintéticos que se construyen de modo que los genes que mantienen con ellos una vinculación operativa presentan estas características. Los genes preferidos desde los que se derivan los elementos de control transcripcional presentan, entre otras, las siguientes características: expresión baja o indetectable en las células pasivas, inducción rápida a nivel transcripcional en cuestión de minutos a partir de la estimulación extracelular, inducción transitoria e independiente de la síntesis de nuevas proteínas, la interrupción subsiguiente de la transcripción precisa la síntesis de nuevas proteínas, y los mRNA transcritos desde estos genes tienen una vida media corta. No es necesario que estén presentes todas estas propiedades.

[0067] Entre los elementos de control transcripcional y promotores adecuados se encuentran los promotores del gen de péptido intestinal vasoactivo (VIP) (receptivo a cAMP. Fink et al., 1988), del gen de la somatostatina (receptivo a cAMP. Montminy et al., 1986), de la proencefalina (receptivo a cAMP, los agonistas nicotínicos y los ésteres de forbol. Comb et al. 1986), del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (receptivo a cAMP. Short et al., 1986), del gen NGFI-A (receptivo a NGF, cAMP y suero. Changelian et al., 1989), los elementos de control transcripcional obtenidos o derivados del gen c-fos, y cualquier otro elemento que los expertos en la materia conozcan o consideren adecuado preparar.

[0068] El protooncogen c-fos es el homólogo celular del gen transformador del virus del osteosarcoma FBJ. Codifica una proteína nuclear que con gran probabilidad forma parte de los procesos normales de diferenciación y crecimiento celular. La transcripción de c-fos se activa rápida y transitoriamente a través de factores de crecimiento e inductores de otras proteínas de la superficie celular, incluyendo las hormonas, los agentes específicos de la diferenciación, los inductores del estrés, los mitógenos y otros inductores conocidos de las proteínas de la superficie celular. La activación depende de la síntesis de proteínas. Entre los elementos de regulación de c-fos se incluye una caja TATA necesaria para iniciar la transcripción, dos elementos en sentido ascendente para la transcripción basal, y un intensificador, que incluye un elemento con simetría de diáda necesario para la inducción por TPA, suero, EGF y PMA. El elemento intensificador transcripcional de 20 pb (pares de bases) se encuentra ubicado entre las bp -317 y -298, en sentido ascendente desde el sitio del casquete de mRNA de c-fos, fundamental para la inducción del suero en las células NIH 3T3 privadas de suero. Uno de los dos elementos situados en sentido ascendente se ubica entre las bp -63 y -57, y es semejante a la secuencia de consenso de la regulación de cAMP.

[0069] Los elementos de control transcripcional, concretamente los relacionados con las realizaciones preferidas de la presente invención, en la cual el interferón de Tipo I o II actúa como señal extracelular, son preferentemente elementos de respuesta al estímulo del interferón (ISRE) o secuencias activadas por interferón gamma (GAS). Aunque existen ISRE diversos, caracterizados a partir de los distintos genes humanos receptivos al interferón de Tipo I, se ha identificado una secuencia de consenso para el ISRE, la ggraaagwGAAActg (N.º Id. sec.: 6. Las mayúsculas indican secuencias del núcleo y el subrayado altos valores de conservación), a la que se une el complejo STAT1/STAT2/IRF9 (Levy et al., 1988). Un ISRE preferido es el gen ISG15 humano, que se presenta como N.º Id. sec.: 5, donde los nucleótidos 41 a 55 corresponden a la secuencia de consenso de ISRE. El ISRE es altamente conservado entre las especies. Por ejemplo, una secuencia presente en la región del promotor del gen Mx del pollo inducible por interferón (Schumacher et al., 1994) es similar a la detectada en primates y es conforme a la secuencia de consenso de ISRE para los genes de mamíferos receptivos al interferón, incluidos roedores y vacas (ver la figura 2 de Perry et al., 1999).

[0070] En cuanto a la secuencia GAS, a la que se une el homodímero STAT1 en los genes receptivos al interferón de Tipo II, se ha identificado una secuencia de consenso, la nnnsanttccgGGAAntgnsn (N.º Id. sec.: 7. Las

mayúsculas indican secuencias del núcleo y el subrayado altos valores de conservación), desde numerosas secuencias de unión seleccionadas (Horvath et al., 1995).

5 [0071] En los casos en que el interferón de Tipo I o II actúa como señal extracelular, se considera una combinación preferida de elementos de control transcripcional un promotor quimérico receptivo al interferón, en el que un elemento ISRE o una secuencia GAS controla un promotor SV40 mínimo, vinculado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto del gen reportero.

10 [0072] El producto del gen reportero, cuyo nivel indica una medida de la presencia y/o el nivel de una molécula que activa la actividad de transducción de señal de un receptor de reconocimiento de patrones o una proteína de la superficie celular, puede ser ARN o una proteína, siempre que resulte fácilmente detectable. Por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga, la *Gaussia* luciferasa, la *Metridia* luciferasa, la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) y el aequorin de medusa son las realizaciones más preferidas de productos génicos reporteros usados en el método según la presente invención. En el caso de la enzima luciferasa de luciérnaga (deWet et al., 1987) y el aequorin de medusa (Rider et al., 2003), el resultado de su actividad enzimática, la luz, se detecta y se mide con un luminómetro, mientras que en el caso de EGFP, puede usarse un analizador o clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) en la longitud de onda adecuada para detectar y cuantificar la cantidad de EGFP expresada en una célula. La curva de distribución de la cantidad de luciferasa, aequorin o EGFP expresada en una muestra de células se determinará en función de la cantidad de ligando (en un intervalo determinado) a la que se exponga la célula. Otros ejemplos no limitativos de productos de genes reporteros adecuados son la dsRED, la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Alton et al., 1979), otros sistemas de detección de enzimas, como la β -galactosidasa, la luciferasa bacteriana (Engebrecht et al., 1984; y Baldwin et al., 1984), la fosfatasa alcalina (Toh et al., 1989; y Hall et al., 1983) y la β -lactamasa humanizada o bacteriana (Zlokarnik et al., 1998).

25 [0073] Para obtener la línea celular que se usa en el método según la presente invención, consistente en una célula de un solo uso que no puede propagarse para otras aplicaciones, la célula transformada con una construcción de genes reporteros se trata con un agente antimitótico o proapoptótico, para que adquiera la propiedad de mantener la actividad de transducción de señal de la proteína de la superficie celular durante al menos 1 hora, pero no más de 30 días a temperaturas por encima del punto de congelación, antes de perder la actividad de transducción de señal e incurrir en muerte celular.

30 [0074] Una realización preferida de la presente invención es el uso de la radiación y como agente antimitótico o proapoptótico, tratando la célula transformada con esta radiación a una intensidad y durante un tiempo suficientes para que la célula irradiada mantenga la actividad de transducción de señal de la proteína de la superficie celular durante al menos 1 hora, de manera preferentepreferentemente durante 7 días, pero no más de 30 días a temperaturas por encima del punto de congelación tras la radiación. Tras este periodo, la célula irradiada incurrirá en muerte celular de forma inmediata (i.e. apoptosis).

35 [0075] Es conocido que la radiación y a una dosis elevada provoca que la célula pierda su actividad de transducción de señal. A una dosis ligeramente inferior, esta radiación provoca que la células deje de replicarse e incurra en muerte celular. Los inventores de la presente invención descubrieron previamente que es posible determinar una dosis que inhiba la replicación y aun así permita a la célula mantener su actividad de transducción de señal durante cierto período de tiempo antes de incurrir en muerte celular. Por ejemplo, la radiación y a 9 grays permite a las células U937 mantener esta actividad durante 14 días, transcurridos los cuales incurrir en muerte celular. No obstante, durante estos 14 días, la actividad de transducción de señal en respuesta, por ejemplo, al interferón de Tipo I que se usa en el ensayo, funciona de la misma manera que lo haría en un control no irradiado. Así, la célula que se somete a radiación y cuenta con una vida útil de 14 días y se inactiva (incurra en muerte celular) una vez transcurrido este periodo, de modo que el usuario final no puede mantenerla ni reproducirla. La dosis de radiación y necesaria variará en función de la línea celular específica que se utilice. Sin embargo, dicha dosis se puede determinar simplemente con experimentaciones rutinarias conforme a lo descrito en WO 2004/039990 y US 2004/0235157.

40 [0076] La dosis (intensidad y duración) de radiación y con la que se trata la célula transformada oscila preferentemente entre 6 y 12 grays (Gy). Como demuestran los experimentos de WO 2004/03 9990 y US 2004/0235157, la temperatura superior a la de congelación, en la cual se mantiene o almacena la célula, afecta su vida útil. Es preferible que dicha temperatura sea temperatura ambiente para mantener de manera ventajosa la sensibilidad máxima de interferón facilitando, asimismo, el almacenamiento y envío de las células comercializadas de un solo uso.

50 [0077] Una segunda realización preferida de la presente invención es el tratamiento de la célula transformada con un agente químico antimitótico o proapoptótico, como la vinblastina, el 5-fluorouracilo (5-Fu), el cisplatino o un agente intercalante antitumoral (como la mitomicina C), en una cantidad y durante un tiempo suficientes para que la célula tratada mantenga la actividad de transducción de señal del receptor de reconocimiento de patrones o la proteína de la superficie celular durante al menos 1 hora, pero no más de 30 días, a temperatura superior a la de congelación tras el tratamiento con el agente. Tras este periodo, la célula tratada incurrirá en muerte celular de forma inmediata. El agente antimitótico o proapoptótico afectará a la célula tratada cuando esta comience a replicarse, por ejemplo,

impidiendo la formación del huso, induciendo la apoptosis y matando a la célula. Así, las células tratadas con un agente antimitótico o proapoptótico, como las células promonocíticas humanas transformadas con una construcción de genes reporteros de la luciferasa, dispondrán de una vida útil aproximada de 24 horas, durante las cuales puede realizarse el ensayo de transducción de señal y a cuyo término las células morirán. Ha de reconocerse que las células con una vida útil de 24 horas carecen de interés desde un punto de vista comercial. Para ampliar su vida útil, las células tratadas pueden congelarse de forma inmediata. En función de los procesos de congelación y descongelación que se apliquen, la vida útil de las células puede ampliarse muy notablemente. No obstante, una vez descongeladas, deberán usarse en un periodo no superior a 24 horas, transcurridas las cuales incurrirán en muerte celular (i.e. apoptosis).

[0078] Debe entenderse que según la creencia convencional la criopreservación de las células requiere el uso de procesos (y equipos) especiales de congelación y descongelación, en los cuales se congelan las células a una velocidad de 1° C por minuto hasta alcanzar los -80° C, o la temperatura aproximada del nitrógeno líquido de -200° C. Llegados a este punto, las células podrían almacenarse indefinidamente y someterse posteriormente a descongelación rápida. También se suele usar sulfoxido de dimetilo (DMSO) u otros criopreservantes para facilitar la protección de las células. Puesto que muchos laboratorios no disponen de instalaciones de almacenamiento a -200° C (ni siquiera a -80° C), resultaría de gran utilidad poder congelar las células a -20° C. No obstante, se conoce que la viabilidad de las células es muy baja cuando se congelan a -20° C y posteriormente se descongelan. Los inventores de la presente invención descubrieron previamente que el DMSO protege las células incluso si se congelan a -20° C, sin necesidad de recurrir a técnicas ni equipos especiales para la congelación y descongelación. Aunque el glicerol, un compuesto criopreservante reconocido, protege las células a -20° C, si se aplica en el porcentaje elevado (50%) que suele utilizarse en la criopreservación, puede impedir la interacción entre los ligandos de las proteínas y los receptores de la superficie. En cualquier caso, puede usarse un porcentaje reducido de esta sustancia (muy inferior al 50% que se usa habitualmente). El DMSO no presenta este inconveniente. Además, puede proteger las células congeladas a -20° C sin necesidad de recurrir a técnicas ni equipos especiales para la congelación y descongelación, y sin alterar la sensibilidad de las células al IFN. Tras el tratamiento con el agente antimitótico o proapoptótico, si además se trata con DMSO, la célula puede disfrutar de una larga vida útil incluso a la temperatura de congelación estándar de -20° C, y una vez descongelada, la célula permanecerá activa (por ejemplo, para realizar ensayos de transducción de señal) durante un periodo aproximado de 24 horas, hasta que se produzca la apoptosis como consecuencia del tratamiento con el agente antimitótico o proapoptótico. Para alcanzar este objetivo puede usarse cualquier agente antimitótico o proapoptótico que induzca la apoptosis para provocar la muerte celular durante el proceso de replicación, como la radiación y agentes químicos como la vinblastina, el 5-FU, el cisplatino o un agente intercalante antitumoral (como la mitomicina C), ya que las células han de mantenerse biológicamente activas durante un periodo de inactividad y, hasta que llegue ese momento, las células tratadas comenzarán a morir.

[0079] La célula transformada tratada se congela a una temperatura y en unas condiciones que le permiten reanudar la transducción de señal tras su descongelación. Aunque es preferente congelar la célula a temperaturas comprendidas entre -20° C y -200° C, preferentemente a -80° C, las células pueden almacenarse posteriormente a -20° C, una temperatura de congelación de fácil acceso en la mayoría de los laboratorios, el objetivo es englobar otras temperaturas adecuadas para la criopreservación de las células, como la temperatura aproximada del nitrógeno líquido de -200° C. Antes de congelar la célula transformada tratada, es además preferente resuspendirla en una solución con un criopreservante. Aunque el criopreservante preferido es el sulfoxido de dimetilo (DMSO), siempre que no interfieran con el uso de la célula tras la descongelación, también pueden usarse otros criopreservantes adecuados que presenten una afinidad elevada de unión con el agua, como el etilenglicol, el polietilenglicol, el propilenglicol, el glicerol, el butanodiol, el propanodiol y la formamida. Si se usa DMSO de forma aislada como criopreservante, la solución debe contener de manera preferente aproximadamente un 10% de DMSO. Más preferente, se usa como criopreservante un 2,5% de DMSO en combinación con un 10% de glicerol.

[0080] El método de la presente invención, que usa un ensayo con genes reporteros para el interferón de Tipo I para determinar el título de los anticuerpos neutralizantes para esta sustancia, es una realización más preferida de la presente invención. Para el producto del gen reportero se usa preferentemente la luciferasa de luciérnaga, el aequorin de medusa o la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), y de manera preferente se controla con un promotor quimérico sensible al interferón que contenga el ISRE de ISG15 y un promotor SV40 mínimo. Las figuras 1 y 2 presentan ejemplos de estas construcciones de genes reporteros. La figura 1 es una representación esquemática de una construcción de genes reporteros de la luciferasa en un vector ISRE-luc (N.º Id. sec.: I), donde el ISRE de ISG15 (N.º Id. sec.: 5) se posiciona en los nucleótidos 38 a 97 de N.º Id. sec.: 1, el promotor SV40 mínimo en los nucleótidos 103 a 288 de N.º Id. sec.: I, y la secuencia de codificación del gen reportero de la luciferasa que contiene la secuencia de aminoácidos de N.º Id. sec.: 2 se posiciona en los nucleótidos 328 a 1980 de N.º Id. sec.: 1. Asimismo, la figura 2 es una representación esquemática de una construcción de genes reporteros de EGFP en un vector ISRE-EGFP (N.º Id. sec.: 3), donde el ISRE de ISG15 se posiciona en los nucleótidos 30 a 89 de N.º Id. sec.: 3, el promotor SV40 mínimo en los nucleótidos 95 a 290 de N.º Id. sec.: 3, y la secuencia de codificación del gen reportero de EGFP que contiene la secuencia de aminoácidos de N.º Id. sec.: 4 se posiciona en los nucleótidos 358 a 1077 de N.º Id. sec.: 3.

[0081] Respecto a la célula que se usa en la realización preferida del ensayo con genes reporteros para el interferón de Tipo I de la presente invención, se usa preferentemente una célula de sujeto mamífero o aviar, y más preferente

una célula humana y, aún más preferente, una célula promonocítica humana. Una célula promonocítica humana preferente que transporta el vector ISRE-luc que contiene la construcción de genes reporteros de la luciferasa, es una célula PIL5. Entre las líneas celulares preferentes se incluyen las humanas mieloides (o U266R), de linfoma de células T (o Jurkatt) y de adenocarcinoma de mama (o MCF7), y las de eritroleucemia o linfoma de ratón (o L1210). La célula se trata para obtener una línea celular apta para su comercialización, con las propiedades necesarias para este fin: que cuente con una vida útil suficiente conforme al objetivo del ensayo y que sea de un solo uso, sin posibilidad de propagación para otras aplicaciones. De manera preferente, la célula 1) se somete a niveles de radiación y comprendidos entre 6 y 12 Gy, preferentemente a 9 Gy, y se almacena a temperatura ambiente durante un máximo de 14 días tras recibir la radiación, o bien 2) se expone a un agente antimetabólico y proapoptótico, como la vinblastina, el cisplatino o el 5-fluorouracilo, preferentemente a vinblastina, durante 10 minutos a 37° C antes de resuspenderse en una solución con un 40% de suero bovino fetal (FBS) y un 2,5% de DMSO, más un 10% de glicerol, y congelarse a -80° C.

[0082] Para optimizar el método de obtención de una célula con una vida útil indefinida durante el almacenamiento en estado de congelación, que morirá aproximadamente a las 24 horas de descongelarse (aunque, una vez descongelado, el producto ofrece una sensibilidad, precisión y selectividad excelentes), pueden utilizarse variaciones de los siguientes parámetros:

1) Concentración de FBS. Además de FBS, podría usarse prácticamente cualquier suero que actúe como depósito tóxico para proteger a las células de las toxinas, por ejemplo, durante los procesos de descongelación o tratamiento con un agente antimetabólico y proapoptótico. La concentración de FBS puede variar los resultados.

2) El tiempo es una variable. Debe considerarse la cantidad de tiempo de exposición a un agente químico antimetabólico o proapoptótico, como la vinblastina, antes de que las células se centrifuguen y se laven para retirar dicho agente (i.e. vinblastina).

3) Usando la vinblastina como ejemplo no limitativo, hay que observar que su formulación es importante. Actualmente se prefiere la vinblastina soluble de la preparación registrada y comercializada en Francia por Eli Lilly bajo el nombre Velbe. Para una fórmula diferente habría que variar ligeramente la combinación de los parámetros.

4) La concentración de vinblastina.

5) La concentración celular durante el tratamiento con vinblastina.

6) La cantidad del crioprotector o la combinación de varios crioprotectores.

[0083] Resulta factible variar todos estos parámetros empíricamente y comprobar los resultados de sensibilidad y precisión tras la congelación, siempre que las células se mantengan vivas durante aproximadamente 24 horas tras su descongelación. Cualquier experto en la materia puede determinar este hecho fácilmente sin experimentación indebida, en particular teniendo en cuenta la información específica que contienen los experimentos de las figuras 11 a 24 de los documentos WO 2004/039990 y US 2004/0235157 sobre las células PIL5, para obtener un producto que básicamente cuente con la misma sensibilidad que las células vivas no tratadas durante un periodo de al menos una hora, preferentemente entre 8 y 24 horas, tras la descongelación, y cuya viabilidad no supere los 30 días, preferentemente los 14 días, más preferentemente los 5 días, y aún más preferentemente los 3 días.

[0084] A continuación se describen ejemplos de protocolos de preparación de las placas de microtitulación del ensayo y las ampollas o los viales de células PIL5 (como células modelo) tratadas con 1 µg/ml de vinblastina como agente antimetabólico y proapoptótico durante 10 minutos a 37° C, antes de proceder a su almacenamiento en estado de congelación a -20° C y a su posterior descongelación para la realización del ensayo.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE MICROTITULACIÓN DEL ENSAYO

[0085]

1. Las células PIL5, a una concentración aproximada de 2×10^7 a 7×10^7 células/ml, en un medio RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal (FBS), se tratan con una solución fresca de 1 µg/ml de vinblastina (fórmula preparada distribuida comercialmente por Eli Lilly bajo el nombre VELBE), diluida a partir de 1 mg/ml en H₂O durante 10 minutos a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂. Si se desea, puede usarse un incubador de CO₂.

2. Las células PIL5 se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos a 4° C, y se laven una vez con el mismo volumen de medio RPMI 1640 de 10% de FBS para retirar la vinblastina.

3. Las células PIL5 se resuspenden a una concentración de 2×10^7 células/ml en un medio RPMI 1640, con un 40% de suero bovino fetal (FBS) y un 2,5% de dimetilsulfóxido, más un 10% de glicerol.

4. La suspensión celular se dispensa en los pocillos de una microplaca de base plana para depositar 300 000 células por pocillo (el equivalente a 25 µl de suspensión celular por pocillo).

5. La microplaca se congela a -80° C en una bolsa de aluminio sellada al vacío con la tapa superior.

6. A partir de este momento y hasta su uso, las microplacas pueden almacenarse durante periodos limitados

a -20° C.

[0086] De manera alternativa, se pueden congelar las células PIL5 a una concentración de 2×10^6 células/ml, en un medio RPMI 1640 con un 40% de suero bovino fetal (FBS) y un 2,5% de dimetilsulfóxido, más un 10% de glicerol, en uno o varios viales de criopreservación. Inmediatamente antes de su uso, el vial se somete a descongelación rápida y las células se distribuyen en una o varias placas de microtitulación. También pueden prepararse viales con células suficientes para media o un cuarto de la placa de microtitulación, según resulte necesario.

PREPARACIÓN DE AMPOLLAS O VIALES DE CRIOPRESERVACIÓN

[0087]

1. Las células PIL5, a una concentración aproximada de 2×10^6 a 7×10^6 células/ml, en un medio RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal (FBS), se tratan con una solución fresca de 1 µg/ml de vinblastina (fórmula preparada distribuida comercialmente por Eli Lilly bajo el nombre VELBE), diluida a partir de 1 mg/ml en H₂O durante 10 minutos a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂. Si se desea, puede usarse un incubador de CO₂.

2. Las células PIL5 se centrifugan a 80 x g durante 10 minutos a 4° C, y se lavan una vez con el mismo volumen de medio RPMI 1640 de 10% de FBS para retirar la vinblastina.

3. Las células PIL5 se resuspenden a una concentración de 2×10^6 células/ml en un medio RPMI 1640, con un 40% de suero bovino fetal (FBS) y un 2,5% de dimetilsulfóxido, más un 10% de glicerol.

4. La suspensión celular (1 ml) se dispensa en un vial de criopreservación y se congela a -80° C.

5. A continuación, el vial de criopreservación puede almacenarse a -20° C hasta su uso.

[0088] Los materiales y métodos necesarios para realizar los ensayos con genes reporteros de la luciferasa con interferón de Tipo I y de neutralización de anticuerpos para este tipo de interferón se presentan en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 2 siguiente.

[0089] A efectos de la divulgación en países distintos de EE. UU. y para la realización en la cual se determina el título de los anticuerpos específicos para un antagonista de la molécula diana predeterminada, el método de la presente invención también que la línea celular usada en el ensayo con genes reporteros conforme al presente método no sea la línea celular que es tratada para mejorar su sensibilidad y selectividad según se describe e reivindica en el documento WO 2008/055153 y, de acuerdo con esto, no sea transformada con una construcción de genes reporteros que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un producto del gen reportero vinculado operativamente a un elemento de control transcripcional que se activa como parte de la vía de transducción de señal iniciada por una primera molécula o complejo de la superficie celular en respuesta a una primera señal extracelular, donde la vía de transducción de señal incluye un factor de transcripción que se une a un elemento de control transcripcional para activarlo y regular la transcripción del gen reportero, mejorando así la sensibilidad o especificidad de la respuesta de la línea celular a la señal extracelular, donde: el elemento de control transcripcional, en el caso de esta línea celular distinta, es una modificación de un elemento de control transcripcional que se produce de forma natural que se activa como parte de la vía de transducción de señal iniciada por la primera molécula o complejo de la superficie celular en respuesta a una primera señal extracelular, o es un promotor sintético que comprende un número óptimo de elementos de respuesta específicos para el factor transcripcional activado por la primera molécula o complejo de la superficie celular, y que carezca de elementos de respuesta para otros factores de transcripción, de modo que la sensibilidad o especificidad del elemento de control transcripcional mejore respecto al elemento de control transcripcional producido de forma natural; y/o las células de esta línea celular carecen de una segunda molécula de la superficie celular que responda, o forme parte de un complejo que responda, a una segunda señal extracelular, donde, de encontrarse presente la segunda molécula de la superficie celular, esta segunda señal extracelular causaría el inicio de una vía de transducción de señal que modularía la transcripción del gen marcador.

[0090] Concluida la descripción general de la presente invención, se aportan como referencia varios ejemplos no limitativos para facilitar la comprensión.

EJEMPLO 1

[0091] Las desventajas de la cuantificación de interferones han sido superadas gracias al desarrollo reciente de un método altamente sensible y fácilmente reproducible para cuantificar la actividad de IFN. Para ello, se establece una línea celular humana transfectada con el gen reportero de la luciferasa bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN. Este método reciente permite determinar la actividad de IFN en cuestión de horas, en contraste con los 3 o 4 días que resultan necesarios para realizar un bioensayo. De forma resumida, el elemento de respuesta al estímulo del interferón (ISRE) del gen ISG15, que controla un promotor SV40 mínimo, se clonó en sentido ascendente respecto al gen reportero de la luciferasa, en un vector ISRE-luc de 5849 pb (fig. 1, N.º Id. sec.: 1). De manera alternativa, también se puede clonar el ISRE del gen ISG15, que controla un promotor SV40 mínimo, en sentido ascendente respecto al gen reportero de una proteína verde fluorescente mejorada (EGFP-1), en un vector ISRE-EGFP de 4412 pb (fig. 2, N.º Id. sec.: 3). Se transfectaron células U937 promonocíticas humanas con la construcción de genes reporteros regulada por el IFN, y se aislaron y clonaron los transfectantes estables. De esta

5 manera, se estableció una línea celular humana PIL5, portadora del gen reportero de la luciferasa, bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN. Esta línea constituye la base de un ensayo que permite determinar la actividad de IFN con mayor celeridad y precisión que el bioensayo antiviral estándar (Lallemant et al., 1996). La tabla 1 presenta las ventajas del ensayo con genes reporteros de la luciferasa para el interferón usando las células PIL5, respecto al bioensayo antiviral estándar. La tabla 2 establece una comparación entre estos dos ensayos en cuanto a la sensibilidad al interferón que se produce como resultado de la infección por virus diversos.

5 TABLA 1

Parámetro	CPE	MxA		Gen reportero	
		ELISA	PCR	Línea celular	Kit <i>iLite</i>
Duración	3-4 días	2-3 días	2-3 días	1-2 días	7-16 horas
Contención	P3	ND	ND	ND	ND
Nivel de especialización del analista	Altamente especializado	Cultivo celular + ensayo	Cultivo celular + ensayo	Cultivo celular + ensayo	Ensayo solamente
Disponibilidad del reactivo	Restringida	Limitada por anticuerpos	Instrumento Q-PCR	Limitado por línea celular	Disponible prontamente
Sensibilidad IU/ml	1,0	ND	ND	10	1,0
Nivel mínimo detectable de IFN (IU/ml)	5,0	ND	ND	1,5	0,2
Selectividad	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta
Variación del ensayo con cultivo celular	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Alto rendimiento	No	Moderado	Moderado	Sí	Sí
Restricciones PI	NA	Sí	Sí	Sí	No
Transferibilidad a CRO	Restringida	Restringida	Restringida	Restringida	Sin restricción

10

TABLA 2

Interferón	Sensibilidad (IU/ml)		Límite inferior de detección (IU/ml)	
	Células vivas	Células tratadas químicamente	Células vivas	Células tratadas químicamente
IntronA™	15	4,0	1,0	0,25
Avonex™	10	2,5	1,5	0,2
Rebif™	10	1,0	1,5	0,2
Betaferon™	10	3,0	2,0	0,5

15

[0092] El ensayo con genes reporteros usando células PIL5 presenta una sensibilidad muy alta (permite detectar de forma rutinaria cantidades inferiores a 1,0 IU/ml de IFN α o IFN β), es fácilmente reproducible (con un error estándar de +/- un 10%) y permite detectar la actividad de IFN en una gran variedad de concentraciones (de 0,1 a 100 IU/ml). Asimismo, el método de ensayo ofrece una gran especificidad y permite detectar, por ejemplo, niveles muy bajos de IFN de Tipo I (IFN α o IFN β) en presencia de niveles elevados de IFN γ , lo que no resulta posible con los bioensayos antivirales convencionales. El ensayo resulta idóneo para determinar la actividad de IFN en fluidos biológicos, como el suero humano, el líquido cefalorraquídeo o la orina, ya que el método está menos sujeto a interferencias no específicas a bajas diluciones que el bioensayo antiviral convencional. A menudo, el suero humano y otros fluidos biológicos contienen inhibidores no específicos de la replicación de virus sin relación con el IFN, lo que puede afectar la replicación de virus en bajas diluciones y generar falsos positivos.

20

25

[0093] El ensayo con genes reporteros de PIL5 para el IFN reconoce cualquier interferón de Tipo I que se une a un receptor de interferón de Tipo I. También permite distinguir entre los distintos subtipos de IFN α , debido a su capacidad para detectar diferencias en las curvas de dosis-respuesta (estándar) que caracterizan a estos subtipos de IFN α individuales. Esta característica tiene un gran valor a la hora de distinguir los interferones que se producen en circunstancias distintas. Los paramixovirus tipo Sendai inducen principalmente IFN α 1, IFN α 2 e IFN β , mientras que el interferón de Tipo I producido por ciertas células en ausencia aparente de infección viral, se corresponde

fundamentalmente con el IFN α 5 (Lallemant et al., 1996). La figura 3 muestra las curvas estándar de actividad de la luciferasa en las células PIL5, en presencia de cantidades diferentes de cada uno de los distintos isotipos de interferón.

5 [0094] Así, este método, desarrollado previamente por los inventores de la presente invención para determinar los niveles de IFN en fluidos biológicos, con el que se han analizado numerosas muestras clínicas de personas infectadas por virus, es rápido, económico, sólido, no requiere la implicación de personal o equipo especializado y puede automatizarse con gran facilidad. No obstante, el ensayo con genes reporteros en células PIL5 se basa en el uso de células vivas, lo que limita su comercialización en su estado actual, dada la muy limitada vida útil de las células y la posibilidad de que los usuarios conserven y cultiven la línea celular PIL5, evitando así la compra de nuevos kits. Los experimentos presentados en el documento WO 2004/039990 y la publicación de solicitud de patente US 2004/0235157, ambos documentos incluidos en el presente documento como referencia, se llevaron a cabo para desarrollar una forma modificada del ensayo con genes reporteros en células PIL5, que tuviera posibilidades de comercialización en formato de kit. Como parte de un ensayo comercial, las células PIL5 se tratan para prolongar suficientemente su vida útil, a cuyo término (o una vez concluido su uso en el ensayo con genes reporteros en células PIL5), estas células incurrren en muerte celular (apoptosis). Tal como se describe en el documento WO 2004/039990 y la publicación de solicitud de patente US 2004/0235157, el planteamiento experimental adoptado se basa en el uso de agentes antimitóticos o proapoptóticos para impedir la multiplicación celular e inducir la muerte celular retardada (apoptosis), al tiempo que se mantiene una vía de transducción de señal de IFN funcional. Asimismo, estos documentos indican que se puede impedir la multiplicación celular e inducir la muerte celular retardada (apoptosis), al tiempo que se mantiene una vía de transducción de señal de IFN funcional con dosis mínimas de radiación y. El contenido íntegro de la publicación de solicitud de patente US 2004/023517 se ha incluido en esta invención como referencia.

25 EJEMPLO 2

[0095] Se ha desarrollado un método de alta sensibilidad y fácilmente reproducible para cuantificar la actividad del IFN de Tipo I, basado en células U937 promonocíticas humanas transfectadas con el gen reportero de la luciferasa, bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN (Lallemant et al., 1996). Este método permite determinar de forma selectiva la actividad de IFN, con gran precisión y en cuestión de horas. Al ser tratadas con la sustancia antimitótica y proapoptótica (vinblastina), las células (PIL5) pueden almacenarse en estado de congelación durante periodos prolongados sin perder la sensibilidad al IFN, sin necesidad de realizar cultivos celulares y obviando las posibles variaciones de ensayo asociadas a la proliferación celular. El uso de este ensayo para determinar el título de neutralización con el método de Kawade (Kawade et al., 1984), que calcula la dilución de suero capaz de reducir la actividad de IFN de 10 a 1 unidades de laboratorio (LU)/ml (Grossberg et al., 2001a, b), ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes (NAB) detectados en pacientes con hepatitis C crónica, que han sido tratados con ROFERONTM o INTRONATM, muestran títulos de NAB comparables a los ensayos realizados para IFN α 2a o IFN α 2b. No obstante, estos títulos resultan significativamente inferiores respecto a IFN α 1 o IFN α 2a pegilado (PEGASYSTM), cuyas actividades específicas son aproximadamente diez veces menores que los correspondientes a IFN α 2a o IFN α 2b. Del mismo modo, aunque el suero de pacientes con RRMS tratados con IFN β -1a (AVONEXTM o REBIFTM) neutraliza en la misma medida ambos tipos de IFN, muestra unos títulos de neutralización significativamente inferiores que los correspondientes a IFN β -1b (BETAFERONTM). Al realizar la prueba con los mismos sueros y una cantidad constante (50 o 250 pg) de proteína IFN, se obtuvieron títulos de neutralización similares para todos los subtipos de IFN α o IFN β que fueron sometidos a la prueba, lo que sugiere que el título de neutralización depende de la actividad específica del subtipo de IFN que se use en el ensayo de neutralización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suero del paciente

50 [0096] Para el presente estudio se seleccionó de forma aleatoria suero de pacientes tratados con IFN α recombinante o IFN β recombinante, a quienes se realizó un seguimiento de la presencia de anticuerpos anti-IFN neutralizantes.

Preparaciones de interferón

55 [0097] IFN α 2a recombinante (ROFERON-ATM): adquirido en Hoffmann-La Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de $9,0 \times 10^6$ IU/ml en células WISH amnióticas humanas infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN α humano (G-023-901-527). La actividad específica de la preparación de interferón fue de 2×10^8 IU/mg de proteína.

[0098] IFN α 2a pegilado (PEGASYSTM): un conjugado de IFN- α 2a con monometoxi PEG ramificado de 40 kDa adquirido en Hoffmann-La Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia.

65 [0099] IFN α 2b recombinante (INTRON-ATM): adquirido en Schering-Plough, Levallois-Perret, Francia. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de 10×10^6 IU/ml en células WISH humanas infectadas con VSV.

Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN α humano (G-023-901-527). La actividad específica de la preparación de interferón fue de 2×10^8 IU/mg de proteína.

5 [0100] IFN α 2b pegilado (PEG-INTRON™): un conjugado de IFN α 2b con monometoxi PEG lineal de 12 kDa adquirido en Schering-Plough, Levallois-Perret, Francia.

10 [0101] IFN β -1a recombinante (AVONEX™): adquirido en Biogen, Nanterre, Francia. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de 6×10^6 IU/ml en células WISH humanas infectadas con VSV. Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN β humano (Gb23-902-531). La actividad específica de la preparación de interferón fue de 2×10^8 IU/mg de proteína.

15 [0102] IFN β -1b recombinante (REBIF™): adquirido en Serono, Boulogne, Francia. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de 6×10^6 IU/ml en células WISH humanas infectadas con VSV. Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN β humano (Gb23-902-531). La actividad específica de la preparación de interferón fue de $2,7 \times 10^8$ IU/mg de proteína.

20 [0103] IFN β -1b recombinante (BETAFERON™): adquirido en Schering AG, Berlín, Alemania. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de 8×10^6 IU/ml en células WISH humanas infectadas con VSV. Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN β humano (Gxb02-901-535). La actividad específica de la preparación de interferón fue de $3,2 \times 10^7$ IU/mg de proteína.

25 [0104] IFN γ humano recombinante: adquirido en PBL, Piscataway, Nueva Jersey. La preparación que se ha usado en este estudio muestra un título de 1×10^7 IU/ml en células WISH humanas infectadas con VSV. Se siguieron los estándares de la preparación internacional de referencia del IFN γ humano (Gxg-902-535). La actividad específica de la preparación de interferón fue de $1,6 \times 10^7$ IU/mg de proteína.

Ensayos con interferón

30 [00105] Bioensayo de IFN: para someter a ensayo la actividad de IFN, se inhibieron los efectos citopáticos (CPE) del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en la línea celular amniótica humana WISH, o en las células HuH7 humanas, conforme a lo descrito con anterioridad (Tovey et al., 1977). O bien, se inhibieron los CPE del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) en células A549 humanas, conforme a lo descrito con anterioridad (Grossberg et al., 2001a).

35 [00106] Ensayo con genes reporteros en células PIL5: el oligonucleótido bicatenario sintético CTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC (N.º Id. sec.: 8), correspondiente al IRSE del gen ISG15, que controla un promotor SV40 mínimo, se clonó en sentido ascendente respecto al gen reportero de la luciferasa mediante la inserción en el sitio Xho/BglII del vector pGL2-promotor (Promega), para generar la construcción de genes reporteros regulada por IFN, conforme a lo descrito con anterioridad (Lallemant et al., 1996). Se transfectaron células U937 promonocíticas humanas con la construcción de genes reporteros regulada por IFN, y se aislaron y clonaron los transfectantes estables. De esta manera, se estableció una línea celular humana (PIL5) portadora del gen reportero de la luciferasa bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN. Las células PIL5 constituyen la base de un ensayo que permite determinar de forma selectiva, con gran precisión y celeridad la actividad de IFN de Tipo I. Las células PIL5 con replicación inhibida, tratadas con vinblastina y preparadas para el ensayo (ensayo de Alfa y Beta de iLite) se adquirieron en NeutekBio, Galway, Irlanda, y se almacenaron en estado de congelación a -80°C hasta su uso, conforme a las instrucciones de los fabricantes. De forma resumida, las células congeladas se sometieron a descongelación rápida y se incubaron durante la noche en una placa de microtitulación de 96 pocillos (50 000 células/pocillo), por duplicado y con diluciones seriadas de IFN. A continuación, las células fueron lisadas agregando el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro (LumiCount™, Packard Instruments Inc, Downers Grove IL). Se determinó la actividad de interferón a partir de la curva dosis-respuesta de unidades relativas de luciferasa (RLU), respecto a la dilución de la preparación de referencia internacional del IFN, Y el resultado se expresó en IU/ml.

Ensayo de neutralización

55 [00107] De forma resumida, las diluciones seriadas del suero humano se incubaron por duplicado durante 1 hora a 37°C y, a continuación, durante 2 horas más a 4°C , con una cantidad constante (10 LU/ml, o de 50 a 250 pg/ml) de una preparación específica de IFN, en un medio RPMI 1640 con un 2% de suero bovino fetal (FBS), en una placa de microtitulación de 96 pocillos. A continuación, se sometió a ensayo la actividad de IFN residual con el bioensayo del IFN o el ensayo con genes reporteros en células PIL5. De forma simultánea, se sometió a ensayo la preparación de IFN que se usó en la prueba de neutralización para determinar su actividad de IFN precisa. Asimismo, se examinó por separado la dilución más baja del suero analizada, para determinar la presencia de actividad o toxicidad de IFN.

65 [00108] El título de neutralización se determinó con el método de cálculo de Kawade (Kawade et al., 1984), que especifica el inverso de la dilución de anticuerpos que reduce la actividad de IFN de 10 a 1,0 LU/ml, según la fórmula $t = f(n-1)/9$, donde f es el inverso de la dilución de anticuerpos y n es la concentración de IFN en LU/ml (Grossberg et

al., 2001a, b). Así, si $n = 10$ LU/ml, $t = f$. Los títulos de neutralización se expresan en unidades de reducción a la décima parte (TRU)/ml (Grossberg et al., 2001a, b). Sus valores se corrigieron para adaptarlos al número real de LU/ml de IFN usado en el ensayo de neutralización, a partir de los valores obtenidos en la titulación de IFN simultánea. Conforme a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), este ensayo de neutralización constituye el estándar aceptado convencionalmente para todos los ensayos de neutralización.

RESULTADOS

10 **Determinación de la actividad de IFN de Tipo I mediante el ensayo con genes reporteros de iLite**

[00109] Se transfectaron células U937 promonocíticas humanas con el gen reportero de la luciferasa, bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN, conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS. Los transfectantes estables se aislaron, se clonaron y se sometieron a pruebas de sensibilidad al IFN. De esta manera, se estableció una línea celular (PIL5), que permite determinar la actividad de IFN humano de Tipo I de forma selectiva, con gran precisión y en cuestión de horas (figuras 4A y 4B). Para evitar las posibles variaciones en el ensayo asociadas al cultivo continuado de líneas celulares, se establecieron bancos de células primarios y de trabajo, y se conservaron en nitrógeno líquido. Para cada lote de células del ensayo se descongeló una ampolla de células PIL5, y se amplificaron las células para un número constante de pases en condiciones estándar. A continuación, se trataron con la sustancia antimitótica vinblastina, que permite almacenar las células preparadas para el ensayo en estado de congelación a -80°C durante periodos prolongados (>3 años), sin perder la sensibilidad al IFN y sin necesidad de realizar cultivos celulares. Este procedimiento obvia las posibles variaciones asociadas a la proliferación celular.

[00110] Las células PIL5 congeladas, preparadas para el ensayo y tratadas con vinblastina (ensayo de Alfa y Beta de iLite, NeutekBio, Galway, Irlanda) se usaron para determinar la actividad de varias preparaciones de IFN bien caracterizadas. De forma resumida, las células congeladas se sometieron a descongelación rápida y se incubaron durante la noche con diluciones seriadas al décimo (1:10) de IFN α 2a (ROFERON-ATM), IFN α 2b (INTRON-ATM), IFN α 2a pegilado (PEGASYSTM), IFN α 2b pegilado (PEG-INTRONTM), IFN β -1a (AVONEXTM), IFN β 1a (REBIFTM) e IFN β -1b (BETAFERONTM). A continuación, las células se lisaron con el sustrato de luciferasa portador del reactivo y se determinó la actividad de la luciferasa con un luminómetro. A continuación, se determinó la actividad de interferón a partir de la curva dosis-respuesta de actividad de la luciferasa expresada en unidades relativas de luz (RLU), respecto a la concentración de IFN expresada en unidades internacionales/ml (IU/ml), en comparación con la preparación internacional de referencia de la OMS para IFN α o IFN β humano. El ensayo de iLite consiguió detectar cantidades de 1,0 IU/ml o inferiores de IFN α o IFN β , con un error estándar de $\pm 15\%$, en una gran variedad de concentraciones de IFN ($<1,0$ a 100 IU/ml) (figuras 4A y 4B). Asimismo, el ensayo de iLite fue capaz de detectar todos los subtipos de IFN α humano sometidos a la prueba (figura 3).

[00111] La actividad específica del IFN α 2a pegilado (PEGASYSTM) determinada con el ensayo de iLite, resultó aproximadamente diez veces menor que la actividad del IFN α 2a no pegilado (ROFERON-ATM), tal como muestra la figura 5A. En esta figura también puede verse que, sin embargo, la actividad específica del IFN α 2b pegilado (PEG-INTRONTM) resultó ser tan solo ligeramente inferior a la del IFN α 2b nativo (INTRON-ATM).

[00112] La actividad de IFN de las preparaciones formuladas clínicamente de IFN β -1a (AVONEXTM), IFN β 1-a (REBIFTM) e IFN β 1-b (BETASERONTM), determinada mediante el ensayo con genes reporteros de iLite (figura 5B), correspondió bien tanto con los valores obtenidos por un bioensayo antiviral (células HuH7/VSV) como con los datos facilitados por los fabricantes (datos no mostrados).

[00113] El ensayo con genes reporteros en células PIL5 puede detectar IFN humano de Tipo I incluso con concentraciones reducidas de IFN γ humano, ya que el IFN γ humano muestra en este ensayo un 10% o menos de reactividad cruzada (datos no mostrados).

[00114] Las células PIL5 congeladas con división inhibida y tratadas con vinblastina mostraron un nivel de sensibilidad mayor, definido como el punto medio de la curva dosis-respuesta de IFN (1,0 LU/ml), un límite inferior de detección de IFN y, en algunos casos, un rango de detección ligeramente menor que las células PIL5 no tratadas (figuras 6A a 6D). Así, para las tres preparaciones formuladas clínicamente de IFN β (AVONEXTM, REBIFTM y BETAFERONTM) 1,0 LU/ml resultó equivalente a 2,5, 1,0 y 3,0 IU/ml respectivamente para las células tratadas con vinblastina, en comparación con los valores de 10, 10 y 11 IU/ml obtenidos para las células no tratadas (figuras 6A a 6D). También se obtuvo un límite de detección inferior para AVONEXTM, REBIFTM y BETAFERONTM, de 0,2, 0,2 y 0,5 IU/ml respectivamente para las células tratadas con vinblastina, en comparación con los valores de 1,5, 1,5 y 2,0 IU/ml obtenidos para las células no tratadas (figuras 6A-6D).

65 **Determinación de la actividad neutralizante de un antisuero anti-IFN α/β policlonal mediante el ensayo con genes reporteros de iLite**

[00115] Con el ensayo con genes reporteros de iLite se determinó el título de neutralización de un antisuero anti-

5 IFN α / β policlonal antihumano de oveja. De forma resumida, diluciones seriadas de un antisuero anti-IFN α / β policlonal humano, para cuya preparaci3n se inmuniz3 a una oveja con IFN linfoblastoide humano purificado, se incubaron con 10 unidades de laboratorio (LU)/ml de IFN α (INTRONATM) o IFN β 1-a (AVONEXTM) en una placa de microtitulaci3n, durante 1 hora a 37° C y, a continuaci3n, durante 2 horas m3s a 4° C. Seguidamente, se agregaron las c3lulas PIL5 congeladas y tratadas con vinblastina a la mezcla de anticuerpos anti-IFN y se incubaron durante la noche a 37° C. El t3tulo de neutralizaci3n se determin3 a partir del inverso de la diluci3n de anticuerpos que redujo la actividad de IFN de 10 a 1,0 unidades de laboratorio/ml (m3todo de Kawade). Los t3tulos de neutralizaci3n de anti-IFN α y anti-IFN β obtenidos para el antisuero anti-IFN α / β policlonal de oveja mediante el ensayo con genes reporteros en c3lulas PIL5 concordaron con los que se obtuvieron mediante el bioensayo antiviral con VSV en c3lulas WISH, dado que esta 3ltima prueba solo detecta diferencias por duplicaci3n o superiores (tabla 3).

Tabla 3. Comparaci3n del t3tulo de neutralizaci3n de un anticuerpo IFN α / β policlonal anti-humano obtenido mediante el ensayo *iLite* con aquellos obtenidos mediante un ensayo CPE

Interfer3n	Antisuero de IFN α / β policlonal Anti-humano : T3tulo medio neutralizante (TRU/ml)	
	Bioensayo VSV/WISH	Ensayo de gen reportero PIL5
IFN α -2b	204.800	240.000
IFN β -1a	2.559	2.500

15 **Determinaci3n de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN humano mediante el ensayo con genes reporteros de *iLite***

20 [00116] La presencia de suero humano de voluntarios sanos a una concentraci3n correspondiente a una diluci3n final de 1:4 en el ensayo con genes reporteros de *iLite*, indic3 valores en RLU id3nticos a los obtenidos para las muestras de control no tratadas (datos no mostrados). Del mismo modo, la presencia de suero humano de voluntarios sanos a una diluci3n final de 1:4 no tuvo ning3n efecto en el t3tulo de IFN de IFN α 2-b (INTRON ATM) o IFN β 1-a (datos no mostrados). No se encontraron niveles detectables de IFN α circulante en ninguna de las muestras procedentes de personas no tratadas, que se sometieron a la prueba sin IFN α agregado (datos no mostrados). Por el contrario, s3 se encontraron niveles detectables de IFN α 2 circulante en ciertas muestras de suero de pacientes con hepatitis C cr3nica tratados con IFN α 2 recombinante, que se sometieron a la prueba sin IFN α agregado, en ausencia de anticuerpos anti-IFN α (datos no mostrados).

30 [00117] Diluciones seriadas de muestras de suero de pacientes con hepatitis C cr3nica tratados con IFN α 2 recombinante, se incubaron con 10 LU/ml de IFN α 2a (ROFERONTM) o IFN α 2b (INTRON ATM) durante 1 hora a 37° C y, a continuaci3n, durante 2 horas m3s a 4° C. Seguidamente, se comprob3 la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN α usando las c3lulas PIL5 congeladas y tratadas con vinblastina (figuras 7A a 7D). Con la metodolog3a de Kawade, pudieron apreciarse diferencias significativas en los t3tulos de neutralizaci3n entre las muestras de pacientes en un intervalo de <20 a 3500 TRU/ml (tabla 4). En los ensayos ciegos, se detectaron grandes coincidencias entre los t3tulos de NAB de las muestras de autoanticuerpos para IFN α determinados con el ensayo de *iLite*, y los valores obtenidos con un bioensayo antiviral (c3lulas HuH7/VSV) (datos no mostrados).

40 [00118] Los t3tulos de neutralizaci3n de sueros de pacientes tratados con IFN α 2a (ROFERONTM) obtenidos resultaron id3nticos a los detectados para IFN α 2a (ROFERONTM) o IFN α 2b (INTRON ATM) mediante un ensayo con genes reporteros de *iLite* (datos no mostrados). Asimismo, los t3tulos de neutralizaci3n de sueros de pacientes tratados con IFN α 2b (INTRON ATM) obtenidos resultaron id3nticos a los valores determinados para IFN α 2a (ROFERONTM) o IFN α 2b (INTRON ATM) mediante un ensayo con genes reporteros de *iLite* (datos no mostrados). No obstante, los t3tulos de neutralizaci3n de sueros de pacientes tratados con IFN α 2a o IFN α 2b revelaron diferencias significativas respecto a los obtenidos para IFN α 1 (tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los títulos de NAB Anti-IFN α obtenidos con dosis de antígeno bien como masa de proteína IFN o bien como 10 Unidades Funcionales de Laboratorio (LU)

Terapia	Nº de suero	Interferón							
		10 LU/ml				250 pg/ml			
		Intron A	IFN α 1	PEG-Intron	Pegasys	Intron A	IFN α 1	PEG-Intron	Pegasys
Intron A	D1	400	<20	150	20	500	8000	1000	1000
Intron A	D2	40	<20	<20	<20	50	60	100	200
Intron A	D3	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Intron A	D4	400	<20	150	10	650	700	1000	1000
Intron A	D5	100	20	35	<20	150	200	180	ND
Intron A	D6	30	<20	<20	<20	40	80	40	70
Intron A	D8	30	<20	<20	<20	ND	ND	ND	ND
Intron A	D11	1000	70	350	40	1500	4000	3000	3000
Intron A	D12	700	<20	250	30	1000	800	1500	1000
Intron A	D13	20	<20	<20	<20	35	<20	20	40
Intron A	D15	50	<20	25	<20	45	<20	80	50
Intron A	D16	3500	450	1000	100	8000	5000	10000	10000

ND: No determinado

5 [00119] En cambio, cuando se utilizó una cantidad constante (250 pg/ml) de proteína IFN α 1 o IFN α 2 (ROFERON™ o INTRON A™) en el ensayo de neutralización, se obtuvieron títulos de neutralización similares para un suero determinado (tabla 4). Asimismo, los títulos de neutralización de sueros de pacientes tratados con IFN α 2a o IFN α 2b mostraron diferencias significativas respecto a los ensayos realizados con 10 LU/ml de IFN α 2a pegilado (PEGASYS™) y, en menor medida, con IFN α 2b (PEG-INTRON™), donde pudieron apreciarse actividades específicas más reducidas que con las correspondientes moléculas nativas (Deisenhammer et al., 2004).

10 [00120] Así, los resultados de los títulos de neutralización de sueros de pacientes tratados con IFN α 2a o IFN α 2b resultaron de forma sistemática inferiores a los resultados obtenidos en ensayos con PEG-INTRON™, y significativamente inferiores a los obtenidos con PEGASYS™ (tabla 4). Por el contrario, se obtuvieron títulos de neutralización similares al realizar el ensayo con los mismos sueros y 250 pg de IFN α 2a (ROFERON™), PEG-INTRON™ o PEGASYS™ (tabla 4). Ninguno de los sueros de pacientes tratados con IFN α 2a (ROFERON™) o IFN α 2b (INTRON A™) fue capaz de neutralizar el IFN β 1-a (datos no mostrados) ni el IFN β 1-b (tabla 4).

15 **Determinación de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN β humano mediante el ensayo con genes reporteros de iLite**

20 [00121] La presencia de suero humano de voluntarios sanos a una dilución final de 1:4 no tuvo ningún efecto en el título de IFN de dos preparaciones diferentes de IFN β 1-a (AVONEX™ y REBIF™) en el ensayo con genes reporteros de iLite (datos no mostrados). En ciertas muestras de suero de pacientes tratados con IFN β que se sometieron a la prueba sin IFN agregado se encontraron niveles detectables de IFN circulante, en ausencia de anticuerpos anti-IFN β humano (datos no mostrados).

25 [00122] Diluciones seriadas de muestras de suero de pacientes tratados con IFN β recombinante, se incubaron con 10 LU/ml de IFN β -a (AVONEX™ o REBIF™) o 10 LU/ml de IFN β 1-b (BETAFERON™), y se sometieron al ensayo de iLite para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN β , conforme a lo descrito en el epígrafe MATERIALES Y MÉTODOS (figuras 8A a 8C). En los ensayos ciegos, los títulos de NAB de las muestras sometidas al ensayo de iLite, con la misma preparación de IFN con la que se trató a los pacientes, mostraron resultados muy próximos a los valores obtenidos con un bioensayo antiviral (datos no mostrados). Los títulos de NAB oscilaron en un intervalo entre <10 y 150 000 TRU/ml. Los títulos de neutralización de sueros de pacientes tratados con IFN β 1-a (AVONEX™ o REBIF™) mostraron resultados idénticos o muy similares a las pruebas realizadas con 10 LU/ml de AVONEX™ o REBIF™, aunque significativamente diferentes a los obtenidos con 10 LU/ml de IFN β 1-b (BETAFERON™), tal como se muestra en la tabla 5. En cambio, al realizar el ensayo de neutralización con una cantidad constante (50 pg/ml) de proteína IFN β 1-a (AVONEX™ o REBIF™) o IFN β 1-b (BETAFERON™), se obtuvieron títulos de neutralización idénticos o muy similares para un suero determinado al usar cualquiera de los tres subtipos de IFN β (tabla 5). Además, cuando se usó una cantidad constante (50 pg/ml) de proteína IFN β en el ensayo de neutralización, los títulos obtenidos para una muestra de suero determinada de un paciente tratado con

IFNβ1-a (AVONEX™ o REBIF™) o IFNβ1-b (BETAFERON™) resultaron muy similares a los obtenidos al realizar el ensayo con el mismo IFN con el que se había tratado al paciente, o con otra subespecie distinta de IFNβ (tabla 5).

5 [00123] Ninguna de las muestras de suero de pacientes tratados con IFNβ recombinante, tanto el IFNβ1-a (AVONEX™ o REBIF™) como el IFNβ1-b (BETAFERON™), fue capaz de neutralizar el IFNα2a (ROFERON™) o IFNα2b (INTRON A™) (datos no mostrados).

10 **Tabla 5. Comparación de los títulos de NAB Anti-IFNα obtenidos con dosis de antígeno bien como masa de proteína IFN o bien como 10 Unidades Funcionales de Laboratorio (LU)**

Terapia	Nº suero	Interferón					
		10 LU/ml			50 pg/ml		
		Betaferon	Rebif	Avonex	Betaferon	Rebif	Avonex
Betaferon	C1	25	100	100	25	40	25
Betaferon	C2	100	350	400	100	150	150
Betaferon	C3	150	700	900	150	200	250
ND	C4	200	900	1.000	200	300	200
Betaferon	C5	15.000	50.000	50.000	15.000	15.000	10.000
Rebif	C6	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Betaferon	C7	600	3.500	4.000	600	700	500
Betaferon	C8	300	7.000	2.500	300	400	350
Rebif	C9	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Betaferon	C10	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Avonex	C11	7.000	35.000	25.000	7.000	8.000	10.000
Betaferon	C12	150	2.000	1.200	150	150	150
ND	C13	4.000	40.000	24.000	4.000	6.000	6.000
Betaferon	C14	200	2.500	2.500	200	200	300
Avonex	B1	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Betaferon	B2	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Avonex	B3	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Avonex	B4	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Rebif	B5	<20	<20	<20	<20	<20	<20
ND	B6	150	700	700	150	150	150
Rebif	B7	100	700	450	100	200	200
Rebif	B8	400	4.000	4.000	400	1.000	900
Betaferon	B9	<20	80	30	<20	<20	<20
ND	B10	<20	25	20	<20	<20	<20
ND	B11	30	300	400	30	35	35

ND: No determinado

ANÁLISIS

15 [00124] La administración repetida de homólogos recombinantes de proteínas humanas puede bajar la tolerancia inmunitaria a los autoantígenos y desencadenar la producción de autoanticuerpos, como ocurre en el caso de los interferones, IL-2, GM-CSF y EPO (Schellekens, 2003). Los autoanticuerpos para el IFNα que se producen en
 20 pacientes con hepatitis C crónica, que han sido tratados con IFNα recombinante, son generalmente anticuerpos de unión, sin consecuencias adversas aparentes para el paciente. No obstante, los anticuerpos neutralizantes aparecen en una proporción elevada de pacientes con RRMS que han sido tratados con IFNβ, y se asocian a una reducción de los efectos terapéuticos y de la progresión de la enfermedad (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). Para detectar anticuerpos neutralizantes es necesario recurrir a ensayos basados en células, que en muchas ocasiones parten de objetivos imprecisos, como la inhibición de la proliferación celular o de los efectos citopáticos virales (Meager, 2006). En un intento de obtener un bioensayo más preciso para el IFN humano de Tipo

l, se aisló un transfectante estable portador del gen reportero de la luciferasa, bajo el control de un promotor quimérico receptivo al IFN. Este método permite determinar de forma selectiva la actividad de IFN, con gran precisión y en cuestión de horas. No obstante, los bioensayos basados en el cultivo continuado de líneas celulares están sujetos a variaciones notables derivadas tanto de la inestabilidad genética que se produce al aumentar el número de pases, como de las variaciones en las condiciones de cultivo (Meager, 2006), independientemente de si el objetivo de medición hace referencia a la actividad de un gen reportero, MxA o CPE. De este modo, para obviar las posibles variaciones en el ensayo asociadas al cultivo continuado de líneas celulares, se establecieron bancos de células primarios y de trabajo, y se conservaron en nitrógeno líquido. A continuación, las células se descongelaron, se amplificaron para un número constante de pases en condiciones estándar y se trataron con una sustancia antimitótica (vinblastina). Este proceso permite almacenar las células preparadas para el ensayo en estado de congelación a -80 ° C durante periodos prolongados (>3 años), sin que estas pierdan la sensibilidad al IFN y sin necesidad de realizar cultivos celulares. La producción de células en condiciones estrictamente controladas y con un número constante de pases, realizada por el fabricante y no por el usuario final, elimina las posibles variaciones asociadas con cambios genéticos y epigenéticos y cambios en las condiciones del cultivo celular, que suelen producirse al cultivar células de forma continuada en laboratorios diferentes. Las células PIL5 congeladas con división inhibida mostraron unos resultados equiparables, y en algunos aspectos superiores, a los correspondientes a las células PIL5 no tratadas. Por ejemplo, las células tratadas con vinblastina mostraron un nivel superior de sensibilidad al IFN y un límite inferior de detección de actividad de IFN en comparación con las células no tratadas. El ensayo en células PIL5 puede automatizarse con gran facilidad y resulta idóneo para realizar rastreos de alto rendimiento de la actividad de IFN o de la presencia de anticuerpos anti-IFN neutralizantes.

[00125] Los valores de actividad de IFN registrados en varias preparaciones bien caracterizadas de IFN α e IFN β humano, determinados mediante el ensayo con genes reporteros en células PIL5, resultaron muy próximos a los valores obtenidos con un bioensayo antiviral. Estas conclusiones se repitieron para los IFN nativos o sus variantes pegiladas. Resulta interesante la obtención de resultados tan similares en un ensayo con genes reporteros, basado en el uso de la secuencia de reconocimiento específica del IFN del gen ISG15, un gen regulado por el IFN que codifica una proteína modificadora similar a la ubiquitina de 17 Da que interviene en la inmunidad innata [Ritchie et al., 2004; y Dao et al., 2005], y en un ensayo basado en la inhibición de los efectos citopáticos virales, que con gran probabilidad refleja el efecto del IFN en numerosos genes individuales.

[00126] De nuevo, a la hora de detectar y cuantificar anticuerpos neutralizantes para IFN α o IFN β humano mediante el ensayo con genes reporteros en células PIL5, se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con un bioensayo antiviral. No obstante, el ensayo con genes reporteros reveló diferencias significativas en el título de neutralización cuando, para realizar la prueba in vitro, se usaron IFN distintos de los utilizados para tratar a los pacientes. Este hecho pudo observarse al usar IFN α 1 o IFN α 2a pegilado (PEGASYS™) para realizar el ensayo con los anticuerpos NAB de pacientes tratados con IFN α 2a (ROFERON™) o IFN α 2b (INTRON A™), y también al usar IFN β 1-b (BETAFERON™) para realizar la misma prueba con pacientes tratados con IFN β 1-a (AVONEX™ o REBIF™). La actividad específica de IFN α 2a (ROFERON™) e IFN α 2b (INTRON A™) es de aproximadamente 2,0 x 10⁸ IU/mg, lo que supone diez veces o más el valor de IFN α 1 (1,0 x 10⁷ IU/mg) o IFN- α 2a pegilado. Según las especificaciones del fabricante, la actividad específica de las dos preparaciones formuladas clínicamente de IFN β 1-a, AVONEX™ o REBIF™, es de 2,0 y 2,7 x 10⁸ IU/mg respectivamente, mientras que la actividad de IFN β 1-b (BETASERON™) es de aproximadamente 3,2 x 10⁷ IU/mg. Así, dadas las diferencias detectadas en la actividad específica de IFN α 1 o IFN α 2a pegilado, en comparación con IFN α 2, y en la actividad específica de IFN α 1-a e IFN β 1-b, si se usa un número constante de unidades de actividad de cualquiera de las distintas preparaciones de IFN α o IFN β , el resultado mostrará cantidades notablemente diferentes de proteína IFN en la reacción de neutralización anticuerpo-antígeno. En cualquier caso, resulta interesante la obtención de títulos de neutralización tan similares usando la misma concentración de proteína IFN α (IFN α 1 o IFN α 2) o IFN β (IFN β 1-a o IFN β 1-b) que se usó en el ensayo de neutralización, en lugar de un número constante de unidades de actividad por ml. Estos resultados sugieren que el título de neutralización depende más de la concentración relativa de antígeno-anticuerpo en el ensayo de neutralización, que de la actividad de IFN o las diferencias específicas de los autoanticuerpos sometidos a la prueba.

[00127] Los autoanticuerpos para IFN α , detectados en los sueros de pacientes tratados con IFN α 2, efectuaron una neutralización cruzada de todas las preparaciones de IFN α sometidas a la prueba (IFN α 1, IFN α 2a, IFN α 2b, PEGASYS™ y PEG-INTRON™). Sin embargo, no neutralizaron ninguna de las preparaciones de IFN β formuladas clínicamente que fueron sometidas a la prueba (AVONEX™, REBIF™ o BETAFERON™). Asimismo, los autoanticuerpos para IFN β , detectados en los sueros de pacientes tratados con IFN β 1-a o IFN β 1-b, no efectuaron una neutralización cruzada de ninguna de las preparaciones de IFN α sometidas a la prueba. Esta falta de neutralización cruzada puede explicar la ausencia de consecuencias adversas aparentes de los autoanticuerpos de IFN en los pacientes tratados con IFN recombinantes, en acusado contraste con las complicaciones potencialmente mortales que se asocian a la presencia de autoanticuerpos para la eritropoyetina o la trombopoyetina, que pueden resultar en aplasia pura de glóbulos rojos y trombocitopenia respectivamente (Schellekens, 2003). No obstante, el desarrollo de anticuerpos NAB para IFN β se asocia a una reducción de la respuesta clínica y la progresión de la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). Varios informes sugieren que debe realizarse un seguimiento semestral o anual de los NAB para IFN β en pacientes con RRMS (Hartung et al., 2007; y Sorensen et al., 2005). Los pacientes que ya no responden a la terapia con IFN β

5 tras desarrollar anticuerpos NAB anti-IFN β , pueden recurrir a terapias alternativas como el acetato de glatirámico y el natalizumab, un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad alpha4 de la integrina alpha4B1 (Rudick et al., 2006). El uso de células PL15 congeladas tratadas con vinblastina ofrece distintas ventajas respecto a los ensayos con IFN existentes con relación a la caracterización de los anticuerpos NAB anti-IFN, y constituye la base de un ensayo que puede automatizarse con gran facilidad y que resulta idóneo para realizar rastreos de anticuerpos neutralizantes anti-IFN.

10 [00128] Aunque la presente invención se ha descrito en función de las realizaciones específicas descritas en este documento, debe entenderse que contempla futuras modificaciones. La presente solicitud pretende dar cabida a las posibles variaciones, usos o adaptaciones de la invención que siguen, en general, los principios de la misma, incluido cualquier desarrollo de la presente divulgación basado en esta, con relación a las prácticas conocidas o habituales en la materia a la que esta pertenece, y que pueda aplicarse a las características esenciales establecidas anteriormente en el ámbito de las reivindicaciones anexas.

REFERENCIAS

- 5 Abramovich et al. (1994) Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. *Embo J.* 13:5871.
- Alton et al. (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282:864-869
- 10 Ank et al *JICR* 2006, 26:373-379
- Antonetti F, Finocchiaro O, Mascia M, Terlizese MG, Jaber A. J. *Interferon & Cytokine Res.* (2002) 22:1181-1184.
- 15 Baldwin et al. (1984) Cloning of the luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 23:3663-3667
- Barbieri et al. (1994) Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta. *Eur J Biochem.* 223:427.
- 20 Basu et al. (1998) The antiviral action of interferon is potentiated by removal of the conserved IRTAM domain of the IFNAR1 chain of the interferon alpha/beta receptor: effects on JAK-STAT activation and receptor down-regulation. *Virology.* 242:14.
- Bazan, (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6934.
- 25 Bertolotto A, Malucchi S, Sala A, Orefice G, Carrieri PB, Capobianco M, Milano E, Melis F, Giordana MT. *J. Neuro Neurosurg. Psychiatry,* (2002) 73:148-153.
- Bouche et al. (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 84:6770-6774
- 30 Boulter et al. (1986) Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* 319:368-374
- 35 Boulter et al. (1990) Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J. Biol. Chem.* 265:4472-4482
- Branca et al. (1981) Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature.* 294:768.
- 40 Bunzow et al. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787
- Canosi et al. (1996) A highly precise reporter gene bioassay for type I interferon. *Journal of Immunological Methods* 199:69-76
- 45 Changelian et al. (1989) Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:377-381
- Changelian et al. (1989) Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:377-381
- 50 Cleary et al. (1994) Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *Journal of Biological Chemistry.* 269:18747.
- 55 Clerico M, Contessa G, Durelli L. Interferon-beta 1a for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2007) 7:535-542.
- Cohen et al. (1995) Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol.* 15:4208.
- 60 Colamonici et al. (1994) Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14:8133.
- Comb et al. (1986) *Nature* 323:353-356
- 65 Constantinescu et al. (1994) Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9602.
- Constantinescu et al. (1995) Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor

- complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10487.
- 5 Cook et al. (1996) Differential responsiveness of a splice variant of the human type I interferon receptor to interferons. *J Biol Chem*. 271:13448.
- Cutrone et al. (1997) Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. *FEBS Lett*. 404:197.
- 10 Dao CT, Zhang DE. ISG15/ A ubiquitin-like enigma. *Front. Biosci.* (2005) 10:2701-2722.
- Darnell et al. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264:1415.
- 15 De Maeyer et al. (1988) Interferons and other regulatory cytokines. John Wiley, New york:69.
- Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. *J. Neurol.* (2004) 251(Suppl. 2):11:31-11:39.
- Deneris et al. (1988) Primary structure and expression of beta 2: a novel subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 1:45-54
- 20 Deneris et al. (1989) Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J. Biol. Chem*. 264: 6268-6272
- deWet et al. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*. 7:725-737
- 25 Diaz et al. (1993) Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Res*. 13:443
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis, E., and Sousa C. (2003). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 303, 1529-1531.
- 30 Dixon et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-79
- Domanski et al. (1995) Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem*. 270:21606.
- 35 Domanski et al. (1996) The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7:143.
- Duvoisin et al. (1989) The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4. *Neuron* 3:487-496
- 40 Ellis et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241:1661-1664
- 45 Engebrecht et al. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *PNAS* 1:4154-4158
- Fiette et al. (1995) Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 181:2069.
- 50 Fink et al. (1988), The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85:6662-6666
- 55 Frielle et al. (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84:7920-7924
- Fu, (1992) A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell*. 70:323.
- 60 Giovannoni G. Optimizing MS disease-modifying therapies: antibodies in perspective. *J. Neurol.* (2004) 251(Supl. 5) v30-v35.
- 65 Goldman et al. (1987) Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* 48:965-973
- Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M, Klein P. The neutralization of interferons by antibody. II: Neutralizing antibody

- unitage and its relationship to bioassay sensitivity: The tenfold reduction unit. *J. Interferon & Cytokine Res.* (2001a) 21:729-742.
- 5 Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M, Yokoyama H, Finter N. The neutralization of interferons by antibody. I; Quantitative and theoretical analysis of the neutralization reaction in different systems. *J. Interferon & Cytokine Res.* (2001b) 21:729-742.
- Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101
- 10 Hammerling et al. (1998) The β -gal interferon assay: a new, precise, and sensitive method. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18:451-460
- 15 Hartung HP, Polman C, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Havrdova E, Hemmer B, Hillert J, Kappos L, Kieseier B, Killestein J, Malcus C, Comabella M, Pachner A, Schellekens H, Sellebjerg F, Selmaj K, Sorensen PS. Neutralizing antibodies to interferon beta : Expert panel report. *J. Neurol* (2007 Apr 24) (Epub ahead of print)
- Hollmann et al. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643-648
- 20 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, and Bauer S. (2003). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-1529.
- 25 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Santon H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K, and Akira, S. (2004). The roles of two ikappaB kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650.
- 30 Horvath et al. (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain *Genes Dev.* 9:984-994
- Hwang et al. (1995) A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:11284.
- 35 Ihle, (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature.* 377:591.
- 40 Jay et al. (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248:490-492
- Johnson et al. (1986) *Cell* 47:545-554
- 45 Julius et al. (1988) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241:558-564
- Julius et al. (1990) The 5HT2 receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *PNAS* 87:928-932
- 50 Kawade Y, Wantanabe Y. Neutralization of interferon by antibody: Appraisals of methods of determining and expressing the neutralization titer. *J. Interferon & Cytokine Res.* (1984) 4:571-584.
- 55 Kayano et al, (1988) Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* 228:187-194
- Kobilka et al. (1987) An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329:75-79
- 60 Kobilka et al. (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238:650-656
- Lallemand C, Lebon P, Rizza P, Blanchard B, Tovey MG. Constitutive expression of specific interferon isotypes in peripheral blood leukocytes from normal individuals and in promonocytiv U937 cells. *J. Leuk.Biol.* (1996) 60:137-146.
- 65 Langer et al. (1996) Interferon receptors. *Biotherapy.* 8:163

- Levitan et al. (1988) Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity. *Nature* 335:76-79
- 5 Levy et al. (1988) Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative control *Genes Dev.* 2:383-393
- Lewis, (1995) A sensitive biological assay for interferons. *Journal of Immunological Methods* 185:9-17
- Lim et al. (1993) Cloning and characterization of a bovine alpha interferon receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1173:314.
- 10 Lleonart et al., (1990) A novel, quantitative bioassay for type I interferon using a recombinant indicator cell line. *Biotechnology* 8:1263-1267
- Lutfalla et al. (1992) The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J Biol Chem.* 267:2802.
- 15 Lutfalla et al. (1995) Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *Embo J.* 14:5100.
- McCormick PL, Scott LJ. Interferon-beta-1b: a review of its use in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *CNR Drugs*, (2004)18:521-546.
- 20 McKinnon, D. (1989) Isolation of a cDNA clone coding for a putative second potassium channel indicates the existence of a gene family. *J. Biol. Chem.* 264:8230-8236
- Meager A. Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application. *Methods* (2006) 38:237-252.
- 25 Merlin et al. (1985) 125I-labelled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data. *J Gen Virol.* 66:1149.
- Montminy et al. (1986), Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6682-6686
- 30 Mouchel-Vielh et al. (1992). Specific antiviral activities of the human alpha interferons are determined at the level of receptor (IFNAR) structure. *FEBS Lett.* 313:255.
- 35 Muller et al. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science.* 264:1918.
- Namaka M, Pollitt-Smith M, Gupta A, Klowak M, Vasconcelos M, Turcotte D, Gong Y, Melanson M. *Curr. Med. Res. Opin.* (2006) 22:223-239.
- 40 Noda et al. (1986) *Nature* 320:188-192
- Noronha A. Neutralizing antibodies to interferon. *Neurology*, (2007) 68(24 Suppl 4):S16-22.
- Novick et al. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* 77:391.
- 45 Perry et al., (1999) Cloning of interferon-stimulated gene 17: The promoter and nuclear proteins that regulate transcription. *Molecular Endocrinology*, 13:1197-1206
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C., and Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses
- 50 Pestka et al. (1987) Interferons and their actions. *A. Rev. Biochem.* 56:727.
- Platanias et al. (1994) Tyrosine phosphorylation of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. Interferon-beta selectively induces tyrosine phosphorylation of an alpha subunit-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269:17761.
- 55 Pritchett et al. (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338:582-585
- 60 Rider et al. (2003) A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science* 301:213-215
- Ritchie KJ, Zhang DE. ISG15: The immunological kin of ubiquitin. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2004) 15:237-246.
- 65 Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, Lublin FD, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. *N. Engl. J. Med.* (2006) 354:911-923.

- Russell-Harde et al. (1995) Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons. *J Biol Chem.* 270:26033.
- 5 Ruth et al. (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245:1115-1118
- Scagnolari C, Duda P, Bagnato F, De Vito G, Alerelli A, Lavolpe V, Girand E, Durastanti V, Trojano M, Kappos L, Antonelli G. Pharmacodynamica of intrefreon beta in multiple sclerosis in patients with and without neutralizing antibodies. *J. Neurol.* (2007) 254:597-604.
- 10 Schellekens H. the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Neurology.* (2003) 61(Suppl 5)S11-S12.
- Schindler et al. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor [see comments]. *Science.* 257:809.
- 15 Schofield et al. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328:221-227
- Schumacher et al. (1994) The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 15:203(1):144-8
- 20 Sheng et al. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485
- 25 Sheppard et al *Nat Immunol.* 2003; 4:63-68
- Shivers, B.D. (1989) *Neuron* 3:327-337
- Short et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:9721-9726
- 30 Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C. Guidelines for use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS task force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* (2005) 12:817-827.
- 35 Steinhoff et al. (1995) Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *Journal of Virology.* 69:2153.
- Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 17-58.
- 40 Stormann et al. (1990) Molecular cloning and expression of a dopamine D2 receptor from human retina. *Molec. Pharm.* 37:1-6
- Tanabe et al. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-E318
- 45 Taniguchi, (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science.* 268:251.
- Tempel et al. (1988) Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature* 332:837-839
- 50 Thoreau et al. (1991) Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* 282:26.
- Toh et al. (1989) Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene. A single gene with two promoters. *Eur. J. Biochem.* 182:231-238
- 55 Tovey M.G., Begon-Lours J, Gresser I., and Morris A.G. Marked enhancement of interferon production in 5-bromodeoxyuridine treated human lymphoblastoid cells. *Nature* (1977) 267:455-457.
- 60 Uddin et al. (1995) Interaction of the transcriptional activator Stat-2 with the type I interferon receptor. *J Biol Chem.* 270:24627.
- Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282, 15319-15323.
- 65 Uze et al. (1990) Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell.* 60:225.

- Uze et al. (1992) Behavior of a cloned murine interferon alpha/beta receptor expressed in homospecific or heterospecific background. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:4774.
- 5 Uzé et al. (1995) Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 15:3.
- van den Broek et al. (1995) Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *Journal of Virology*. 69:4792.
- 10 Vandenbroek et al. (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev*. 148:5.
- 15 Velazquez et al. (1995) Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem*. 270:3327.
- Wada et al. (1988) Functional expression of a new pharmacological subtype of brain nicotinic acetylcholine receptor. *Science* 240:330-334
- 20 Yan et al. (1996) Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 16:2074.
- Yan et al. (1996) Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J*. 15:1064.
- 25 Yeh et al. (1987) Ultrastructural localization of a platelet-derived growth factor/v-sis-related protein(s) in cytoplasm and nucleus of simian sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:2317-2321
- 30 Ymer et al. (1989) GABAA receptor beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. *EMBO J*. 8:1665-1670
- Yoneyama, M., Fujita, T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 282, 15315-15318.
- 35 Zlokarnik et al. (1998) Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with β -lactamase as reporter. *Science* 279:84-88.

Listado de secuencias

[0130]

<110> TOVEY, Michael
LALLEMAND, Christophe

<120> METHOD FOR CONDUCTING AN ASSAY FOR NEUTRALIZING ANTIBODIES

<130> TOVEY9APCT

<150> US60/983,813
<151> 2007-10-30

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5849
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> CDS
<222> (328)..(1980)

<400> 1
cccgggaggt accgagctct tacgcgtgct agctcgactc gggaaagga aaccgaaact 60
gaagcccctc gggaaagga aaccgaaact gaagcccgat ctgcatctca attagtcagc 120
aaccatagtc ccgccctaa ctccgccat ccgccctta actccgccca gttccgccca 180
ttctccgcc catggetgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgctcggc 240
ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggctaggct tttgcaaaaa 300
gcttggcatt ccggtactgt tggtaaa atg gaa gac gcc aaa aac ata aag aaa 354
Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys
1 5
ggc ccg gcg cca ttc tat cct cta gag gat gga acc gct gga gag caa 402
Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln
10 15 20 25
ctg cat aag gct atg aag aga tac gcc ctg gtt cct gga aca att gct 450
Leu His Lys Ala Met Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala
30 35 40
ttt aca gat gca cat atc gag gtg aac atc acg tac gcg gaa tac ttc 498
Phe Thr Asp Ala His Ile Glu Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe
45 50 55
gaa atg tcc gtt cgg ttg gca gaa gct atg aaa cga tat ggg ctg aat 546
Glu Met Ser Val Arg Leu Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn
60 65 70
aca aat cac aga atc gtc gta tgc agt gaa aac tct ctt caa ttc ttt 594

Thr	Asn	His	Arg	Ile	Val	Val	Cys	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Phe	Phe		
	75					80					85						
atg	ccg	gtg	ttg	ggc	gcg	tta	ttt	atc	gga	ggt	gca	ggt	gcg	ccc	gcg		642
Met	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala		
90				95					100					105			
aac	gac	att	tat	aat	gaa	cgt	gaa	ttg	ctc	aac	agt	atg	aac	att	tcg		690
Asn	Asp	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Asn	Ile	Ser		
				110					115					120			
cag	cct	acc	gta	gtg	ttt	ggt	tcc	aaa	aag	ggg	ttg	caa	aaa	att	ttg		738
Gln	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Val	Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu		
			125					130					135				
aac	gtg	caa	aaa	aaa	tta	cca	ata	atc	cag	aaa	att	att	atc	atg	gat		786
Asn	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Ile	Met	Asp		
		140					145						150				
tct	aaa	acg	gat	tac	cag	gga	ttt	cag	tcg	atg	tac	acg	ttc	gtc	aca		834
Ser	Lys	Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly	Phe	Gln	Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Val	Thr		
	155					160						165					
tct	cat	cta	cct	ccc	ggt	ttt	aat	gaa	tac	gat	ttt	gta	cca	gag	tcc		882
Ser	His	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe	Asn	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Glu	Ser		
170					175					180					185		
ttt	gat	cgt	gac	aaa	aca	att	gca	ctg	ata	atg	aat	tcc	tct	gga	tct		930
Phe	Asp	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser		
				190					195					200			
act	ggg	tta	cct	aag	ggt	gtg	gcc	ctt	ccg	cat	aga	act	gcc	tgc	gtc		978
Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Ala	Cys	Val		
			205					210						215			
aga	ttc	tcg	cat	gcc	aga	gat	cct	att	ttt	ggc	aat	caa	atc	att	ccg		1026
Arg	Phe	Ser	His	Ala	Arg	Asp	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Gln	Ile	Ile	Pro		
		220					225						230				
gat	act	gcg	att	tta	agt	ggt	ggt	cca	ttc	cat	cac	ggt	ttt	gga	atg		1074
Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met		
		235				240					245						
ttt	act	aca	ctc	gga	tat	ttg	ata	tgt	gga	ttt	cga	gtc	gtc	tta	atg		1122
Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met		
250				255					260					265			
tat	aga	ttt	gaa	gaa	gag	ctg	ttt	tta	cga	tcc	ctt	cag	gat	tac	aaa		1170
Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Glu	Leu	Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys		
				270					275					280			
att	caa	agt	gcg	ttg	cta	gta	cca	acc	cta	ttt	tca	ttc	ttc	gcc	aaa		1218
Ile	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Val	Pro	Thr	Leu	Phe	Ser	Phe	Phe	Ala	Lys		
			285					290					295				
agc	act	ctg	att	gac	aaa	tac	gat	tta	tct	aat	tta	cac	gaa	att	gct		1266
Ser	Thr	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Ile	Ala		
		300					305						310				
tct	ggg	ggc	gca	cct	ctt	tcg	aaa	gaa	gtc	ggg	gaa	gcg	ggt	gca	aaa		1314
Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser	Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Lys		

ES 2 409 356 T3

315	320	325	
cgc ttc cat ctt cca ggg ata cga caa gga tat ggg ctc act gag act			1362
Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr			
330	335	340	345
aca tca gct att ctg att aca ccc gag ggg gat gat aaa ccg ggc gcg			1410
Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala			
	350	355	360
gtc ggt aaa gtt gtt cca ttt ttt gaa gcg aag gtt gtg gat ctg gat			1458
Val Gly Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp			
	365	370	375
acc ggg aaa acg ctg ggc gtt aat cag aga ggc gaa tta tgt gtc aga			1506
Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg			
	380	385	390
gga cct atg att atg tcc ggt tat gta aac aat ccg gaa gcg acc aac			1554
Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn			
	395	400	405
gcc ttg att gac aag gat gga tgg cta cat tct gga gac ata gct tac			1602
Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr			
	410	415	420
tgg gac gaa gac gaa cac ttc ttc ata gtt gac cgc ttg aag tct tta			1650
Trp Asp Glu Asp Glu His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu			
	430	435	440
att aaa tac aaa gga tat cag gtg gcc ccc gct gaa ttg gaa tcg ata			1698
Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile			
	445	450	455
ttg tta caa cac ccc aac atc ttc gac gcg ggc gtg gca ggt ctt ccc			1746
Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro			
	460	465	470
gac gat gac gcc ggt gaa ctt ccc gcc gcc gtt gtt gtt ttg gag cac			1794
Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His			
	475	480	485
gga aag acg atg acg gaa aaa gag atc gtg gat tac gtg gcc agt caa			1842
Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln			
	490	495	500
gta aca acc gcg aaa aag ttg cgc gga gga gtt gtg ttt gtg gac gaa			1890
Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu			
	510	515	520
gta ccg aaa ggt ctt acc gga aaa ctc gac gca aga aaa atc aga gag			1938
Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu			
	525	530	535
atc ctc ata aag gcc aag aag ggc gga aag tcc aaa ttg taa			1980
Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu			
	540	545	550
aatgtaactg tattcagcga tgacgaaatt cttagctatt gtaatactgc gatgagtggc			2040
agggcggggc gtaatttttt taaggcagtt attggtgcc ttaaagcct ggtgctacgc			2100

ES 2 409 356 T3

ctgaataagt gataataagc ggatgaatgg cagaaattcg ccggatcttt gtgaaggaac 2160
cttacttctg tgggtgacaa taattggaca aactacctac agagatttaa agctctaagg 2220
taaataaaa atttttaagt gtataatgtg ttaaactact gattctaatt gtttgtgtat 2280
tttagattcc aacctatgga actgatgaat gggagcagtg gtggaatgcc tttaatgagg 2340
aaaacctggt ttgctcagaa gaaatgccat ctagtatga tgaggctact gctgactctc 2400
aacattctac tcctccaaaa aagaagagaa aggtagaaga cccaaggac tttccttcag 2460
aattgctaag ttttttgagt catgctgtgt ttagtaatag aactcttgct tgctttgcta 2520
tttacaccac aaaggaaaaa gctgcactgc tatacaagaa aattatggaa aaatattctg 2580
taacctttat aagtaggcat aacagtata atcataacat actgtttttt cttactccac 2640
acaggcatag agtgtctgct attaataact atgctcaaaa attgtgtacc ttagctttt 2700
taatttgtaa aggggttaat aaggaatatt tgatgtatag tgccttgact agagatcata 2760
atcagccata ccacatttgt agaggtttta ctgctttaa aaaacctccc acacctcccc 2820
ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat 2880
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg 2940
cattctagtt gtgggtttgtc caaactcacc aatgtatctt atcatgtctg gatccgtcga 3000
ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc agctccttcc ggtgggctcg gggcatgact 3060
atcgtcgcg cacttatgac tgtcttctt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccgca 3120
gcgctcttcc gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 3180
ggtatcagct cactcaaagc cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3240
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct 3300
ggcgttttcc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3360
gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctcct 3420
cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctccttc 3480
gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtegt 3540
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgct gcgccttatc 3600
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3660
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3720
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3780
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3840
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgctcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3900

ES 2 409 356 T3

tcctttgac tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat 3960
 tttggtcag agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 4020
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat 4080
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc 4140
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 4200
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 4260
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 4320
 ccgggaagct agagtaagta gttcggcagt taatagtgtg cgcaacgttg ttgccattgc 4380
 tacaggcatc gtgggtgcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 4440
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtcctctcg 4500
 tcctccgac gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatgg ttatggcagc 4560
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgttaagatgc tttctgtga ctggtgagta 4620
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc 4680
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 4740
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 4800
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 4860
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat 4920
 actcactctc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 4980
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacatttcc 5040
 ccgaaaagtg ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtgt 5100
 tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt 5160
 cccttccttt ctgccacgt tcgccggtt tcccctgcaa gctctaaatc gggggctccc 5220
 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga 5280
 tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc 5340
 cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcgtt 5400
 ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggttaa aaaatgagct 5460
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttaca tttcccattc 5520
 gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg 5580
 ccagcccaag ctaccatgat aagtaagtaa tattaaggtg cgtggagggt ttacttgctt 5640
 taaaaaacct ccacacctc cccctgaacc tgaacataa aatgaatgca attgttgttg 5700
 ttaacttgtt tattgcagct tataatgggt acaaataaag caatagcatc acaaatttca 5760

ES 2 409 356 T3

caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat 5820

cttatggtag tgtaactgag ctaacataa 5849

<210> 2

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
35 40 45

Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
100 105 110

Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
115 120 125

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
130 135 140

Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
145 150 155 160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
165 170 175

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile

ES 2 409 356 T3

180 185 190

Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
195 200 205

Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
210 215 220

Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
225 230 235 240

Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
245 250 255

Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
260 265 270

Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
275 280 285

Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
290 295 300

Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
305 310 315 320

Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
325 330 335

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
370 375 380

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
420 425 430

ES 2 409 356 T3

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
 465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540

Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 545 550

<210> 3
 <211> 4412
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<220>
 <221> CDS
 <222> (358)..(1077)

<400> 3
 tagttattac tagcgctacc ggactcagac tcgggaaagg gaaaccgaaa ctgaagcccc 60
 tcgggaaagg gaaaccgaaa ctgaagcccc atctgcatct caattagtca gcaaccatag 120
 tcccgccct aactccgcc atcccgccc taactccgcc cagtccgcc cattctccgc 180
 cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc 240
 tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa tctcgagctc 300
 aagcttcgaa ttctgcagtc gacggtagcg cgggcccggg atccaccggt cggcacc 357
 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 405

ES 2 409 356 T3

Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu		
1				5					10					15			
gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac	gta	aac	ggc	cac	aag	ttc	agc	gtg	tcc	ggc		453
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly		
			20					25					30				
gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc	acc	tac	ggc	aag	ctg	acc	ctg	aag	ttc	atc		501
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile		
		35					40					45					
tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg	ccc	gtg	ccc	tgg	ccc	acc	ctc	gtg	acc	acc		549
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr		
	50					55					60						
ctg	acc	tac	ggc	gtg	cag	tgc	ttc	agc	cgc	tac	ccc	gac	cac	atg	aag		597
Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys		
65					70				75						80		
cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	tac	gtc	cag	gag		645
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu		
				85					90					95			
cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag	gac	gac	ggc	aac	tac	aag	acc	cgc	gcc	gag		693
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu		
			100					105					110				
gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac	acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	gag	ctg	aag	ggc		741
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly		
		115					120					125					
atc	gac	ttc	aag	gag	gac	ggc	aac	atc	ctg	ggg	cac	aag	ctg	gag	tac		789
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr		
	130					135					140						
aac	tac	aac	agc	cac	aac	gtc	tat	atc	atg	gcc	gac	aag	cag	aag	aac		837
Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn		
145					150					155					160		
ggc	atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	cgc	cac	aac	atc	gag	gac	ggc	agc		885
Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser		
				165				170						175			
gtg	cag	ctc	gcc	gac	cac	tac	cag	cag	aac	acc	ccc	atc	ggc	gac	ggc		933
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly		
			180					185					190				
ccc	gtg	ctg	ctg	ccc	gac	aac	cac	tac	ctg	agc	acc	cag	tcc	gcc	ctg		981
Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu		
		195					200					205					
agc	aaa	gac	ccc	aac	gag	aag	cgc	gat	cac	atg	gtc	ctg	ctg	gag	ttc		1029
Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe		
	210					215					220						
gtg	acc	gcc	gcc	ggg	atc	act	ctc	ggc	atg	gac	gag	ctg	tac	aag	taa		1077
Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys			
225					230				235								
agcggccgcg	actctagatc	ataatcagcc	ataccacatt	tgtagaggtt	ttacttgctt												1137

ES 2 409 356 T3

taaaaaacct cccacacctc ccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attggtggtg 1197
 ttaacttggt tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca 1257
 caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaactc atcaatgtat 1317
 cttaaggcgt aaattgtaag cgtaatat ttgttaaaat tgcggttaa tttttgtaa 1377
 atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa 1437
 tagaccgaga tagggttgag tgttgtcca gtttgaaca agagtccact attaaagaac 1497
 gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 1557
 ccatcacct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaacct 1617
 aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg gaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 1677
 ggaagaaaag cgaaggagc gggcgttag gcgctgcaa gtgtagcggc cacgctgcgc 1737
 gtaaccacca cccccgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgctcagg tggcacttt 1797
 cggggaaatg tgcgccaac ccctatttgt ttattttct aaatacttc aaatatgtat 1857
 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaag gaagagctc 1917
 gaggcgaaa gaaccagctg tgaatgtgt gtcagttagg gtgtgaaaag tccccaggct 1977
 cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtgaa 2037
 agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tcaaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2097
 ccatagtc cccttaact ccgccatcc cgcctaac tccgccagt tccgccatt 2157
 ctccgcccc tggctgacta attttttta ttatgcaga ggccgaggcc gcctcgcc 2217
 ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaagatc 2277
 gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg 2337
 tctccggccg cttgggtgga gaggctatc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 2397
 tgctctgatg ccgccgtgt ccggctgtca gcgaggggc gcccggttct tttgtcaag 2457
 accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg cagcgggct atcgtggctg 2517
 gccacgacgg gcgttcctg cgcagctgtg ctgcagctt tcaactgaagc ggaaggac 2577
 tggctgctat tggcggaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc 2637
 gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc 2697
 tgcccattcg accaccaagc gaaacatcg atcagcagc cacgtactcg gatggaagcc 2757
 ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg 2817
 ttcgccaggc tcaaggcgag catgcccgac ggcgaggatc tcgctgtgac ccatggcgat 2877
 gcctgcttgc cgaatatcat ggtgaaaaat ggccgcttt ctggattcat cgactgtggc 2937
 cggctgggtg tggcgaccg ctatcaggac atagcgttg ctaccctga tattgctgaa 2997

ES 2 409 356 T3

gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat 3057
tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg 3117
tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccc 3177
ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg tttccggga cgccggctgg atgatcctcc 3237
agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccctag ggggaggcta actgaaacac 3297
ggaaggagac aataccggaa ggaaccocg ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa 3357
cgcacgggtg tgggtcgttt gttcataaac gcggggttcg gtcccagggc tggcaactcg 3417
tcgatacccc accgagacc cttggggccc aatacgccc cgtttcttcc ttttcccac 3477
cccaccccc aagttcgggt gaaggcccag ggctcgcagc caacgtcggg gcggcaggcc 3537
ctgccatagc ctcaaggttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 3597
ttaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaate ccttaacgtg 3657
agttttcgtt ccaactgagcg tcagacccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 3717
cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaa accaccgcta ccagcgggtg 3777
ttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 3837
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 3897
ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg 3957
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 4017
ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 4077
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac gcttcccga gggagaaagg 4137
cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 4197
gggaaacgc ctggtatctt tatagtctg tcgggttctg ccacctctga cttgagcgtc 4257
gatttttgtg atgetcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 4317
ttttacggtt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttctct gcgttatccc 4377
ctgattctgt ggataaccgt attaccgcca tgcac 4412

<210> 4
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

ES 2 409 356 T3

1	5	10	15																
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly				
			20					25					30						
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile				
		35					40					45							
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr				
	50					55					60								
Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys				
65					70					75					80				
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu				
			85						90					95					
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu				
			100					105						110					
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly				
		115					120					125							
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr				
	130					135					140								
Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn				
145					150					155					160				
Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser				
				165					170					175					
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly				
			180					185					190						
Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu				
		195					200					205							
Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe				
	210					215					220								
Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys					
225					230					235									
<210>	5																		
<211>	60																		

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 5
 ctcgggaaag ggaaaccgaa actgaagccc ctcgggaaag ggaaaccgaa actgaagccc 60

 <210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 6
 ggrraaagwga aactg 15

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> n is either a, c, g, or t.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is either a, c, g, or t.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n is either a, c, g, or t.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n is either a, c, g, or t.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is either a, c, g, or t.

 <400> 7
 nnsanttcc gggaantgns n 21

 <210> 8

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic

<400> 8
ctcgggaaag ggaaaccgaa actgaagcc

29

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para realizar un ensayo de neutralización para el título de los anticuerpos en una muestra, donde dichos anticuerpos son específicos para una molécula diana predeterminada que activa la actividad de transducción de señal de una proteína de una superficie celular o de un receptor de reconocimiento de patrones, o son específicos para un antagonista de dicha molécula diana predeterminada, donde dicho método comprende:
- 10 la preparación de una dilución seriada de la muestra;
la adición a cada dilución de una cantidad fija de la molécula diana, donde dicha cantidad se corresponde con una unidad de actividad predeterminada de la molécula diana, y donde la concentración de molécula diana es la misma en cada dilución;
- 15 la realización de un ensayo con genes reporteros a cada una de las diluciones para determinar la cantidad de actividad residual de la molécula diana en cada dilución, donde dicho ensayo con genes reporteros comprende la medición del nivel de un producto de genes reporteros cuando dicha dilución entra en contacto con una línea celular transformada mediante una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican un producto del gen reportero, vinculado operativamente a uno o varios elementos de control transcripcional, que se regula por la actividad de transducción de señal de una proteína de la superficie celular o de un receptor de reconocimiento de patrones en respuesta a una señal extracelular generada por dicha molécula diana; y
- 20 la determinación de la dilución en la que la actividad de la molécula diana agregada se reduce un factor predeterminado x, donde dicho título se expresa como una reducción de x veces en unidades de actividad/ml, donde la sensibilidad del ensayo de neutralización aumenta, donde la línea celular usada en dicho ensayo con genes reporteros se ha tratado con un agente antimetabólico o proapoptótico para que adquiera la propiedad de mantener dicha actividad de transducción de señal durante al menos alrededor de una hora, aunque perderá dicha actividad e incurrirá en muerte celular en un plazo no superior a 30 días a una temperatura superior a la temperatura de congelación.
- 25 2. El método según la reivindicación 1, donde dicha línea celular tratada, sustancialmente de manera inmediata tras el tratamiento, se ha resuspendido en una solución que contiene un crioprotector, se ha congelado aproximadamente a -80° C y posteriormente se ha descongelado antes de su uso en dicho ensayo con genes reporteros.
- 30 3. El método según la reivindicación 2, donde dicho crioprotector es dimetilsulfóxido (DMSO) y dicha solución contiene un 10% de DMSO.
- 35 4. El método según la reivindicación 2, donde dicho crioprotector es una combinación de un 2,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y un 10% de glicerol.
- 40 5. El método según las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente antimetabólico o proapoptótico es vinblastina.
- 45 6. El método según las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente antimetabólico o proapoptótico es 5-fluorouracilo.
7. El método según las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente antimetabólico o proapoptótico es mitomicina C, un agente intercalante antitumoral.
- 50 8. El método según las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente antimetabólico o proapoptótico es una radiación γ , y donde dicha línea celular ha sido irradiada con radiación γ a una intensidad y durante un tiempo suficientes para mantener dicha actividad de transducción de señal durante al menos 1 hora, aunque pierde dicha actividad e incurrir en muerte celular en un plazo no superior a 30 días a una temperatura superior a la temperatura de congelación.
- 55 9. El método según las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha proteína de la superficie celular es un receptor de superficie celular.
10. El método según la reivindicación 9, donde dicho receptor de la superficie celular se selecciona de un grupo compuesto por un receptor de citoquinas, un receptor de factores de crecimiento, un receptor de hormonas, un neurorreceptor, un receptor de células T, un receptor de antígenos, y un receptor complementario.
- 60 11. El método según la reivindicación 9, donde dicho receptor de la superficie celular es un receptor de interferón de Tipo I, y dicha señal extracelular es proporcionada por un interferón de Tipo I como la molécula diana predeterminada.
- 65 12. El método según la reivindicación 11, donde la molécula diana predeterminada es un interferón α .
13. El método según la reivindicación 11, donde la molécula diana predeterminada es un interferón β .

14. El método según la reivindicación 11, donde dicho elemento o elementos de control transcripcional comprenden un elemento de respuesta al estímulo del interferón (ISRE).
- 5 15. El método según la reivindicación 14, donde dicho ISRE comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:5.
16. El método según la reivindicación 9, donde dicho receptor de la superficie celular es un receptor de interferón de Tipo II, y dicha señal extracelular está proporcionada por un interferón de Tipo II como la molécula diana predeterminada.
- 10 17. El método según la reivindicación 16, donde dicho elemento o elementos de control transcripcional comprenden una secuencia activada por interferón gamma (GAS).
- 15 18. El método según las reivindicaciones 1 a 17, donde dicho producto del gen reportero se selecciona de un grupo compuesto por luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, aequorin de medusa, proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), dsRED, β -galactosidasa, y fosfatasa alcalina.
19. El método según las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho factor predeterminado x es 10.
- 20 20. El método según las reivindicaciones 1 a 19, donde la línea celular es una línea celular de origen mamífero o aviar.
21. El método según las reivindicaciones 1 a 20, donde la línea celular es una línea celular humana.
- 25 22. El método según la reivindicación 21, donde la línea celular humana es una línea celular promonocítica humana.
23. El método según la reivindicación 22, donde la línea celular promonocítica humana es una línea de células U937.
- 30 24. El método según las reivindicaciones 1 a 23, donde dicha propiedad de la línea celular usada en dicho ensayo con genes reporteros es que mantendrá la actividad de transducción de señal durante al menos ocho horas, aunque perderá dicha actividad e incurrirá en muerte celular en un plazo no superior a 24 horas, a una temperatura superior a la temperatura de congelación.
- 35 25. El método según las reivindicaciones 1 a 23, donde dicha propiedad de la línea celular usada en dicho ensayo con genes reporteros es tal que mantendrá la actividad de transducción de señal durante al menos dieciocho horas, aunque perderá dicha actividad e incurrirá en muerte celular en un plazo no superior a 14 días.

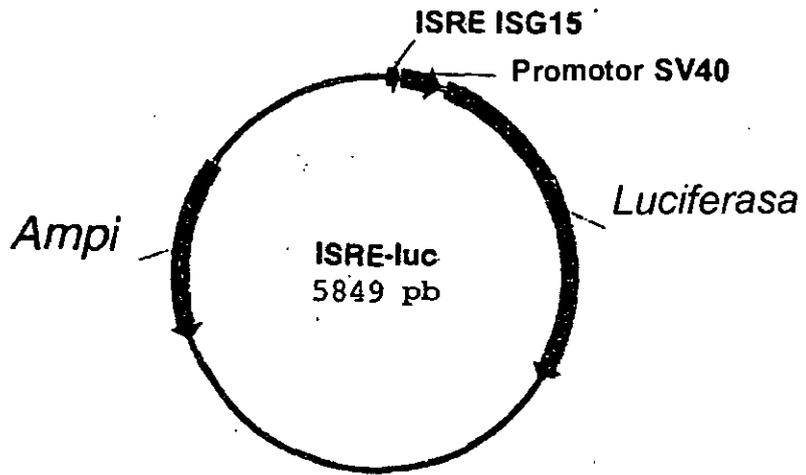


FIG. 1

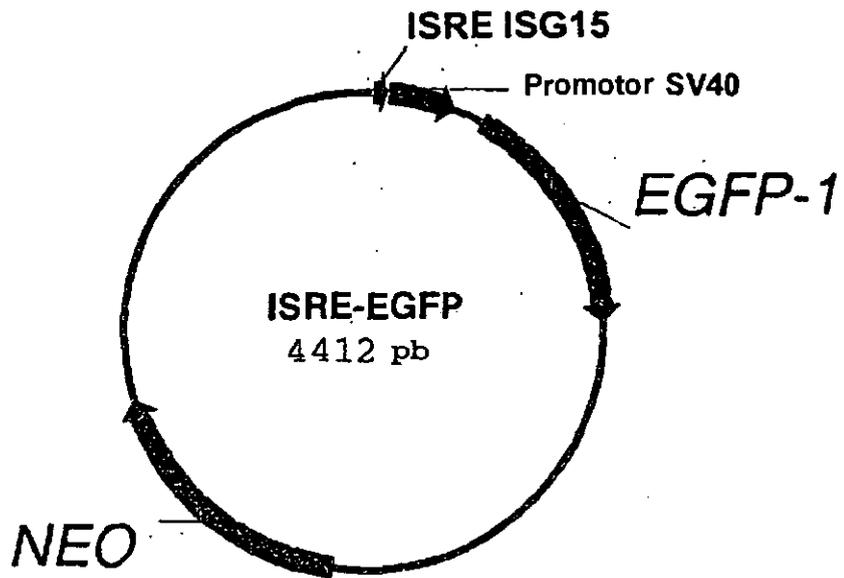


FIG. 2

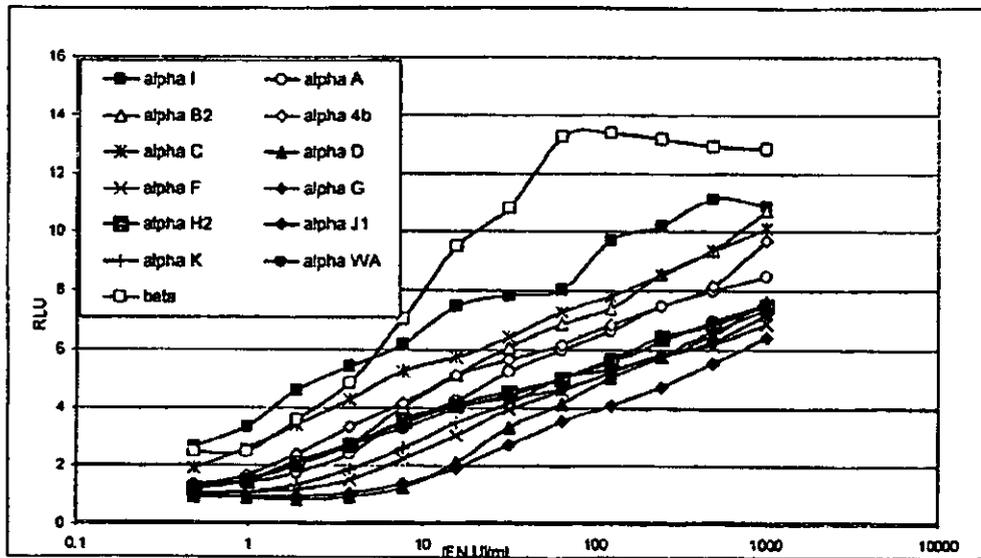


Fig. 3

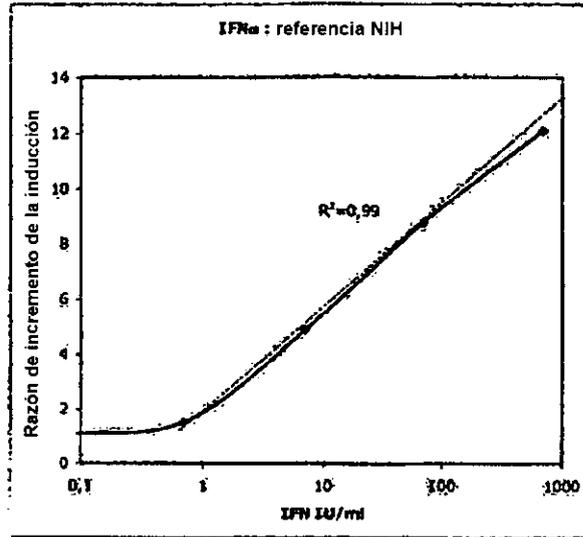


Fig. 4A

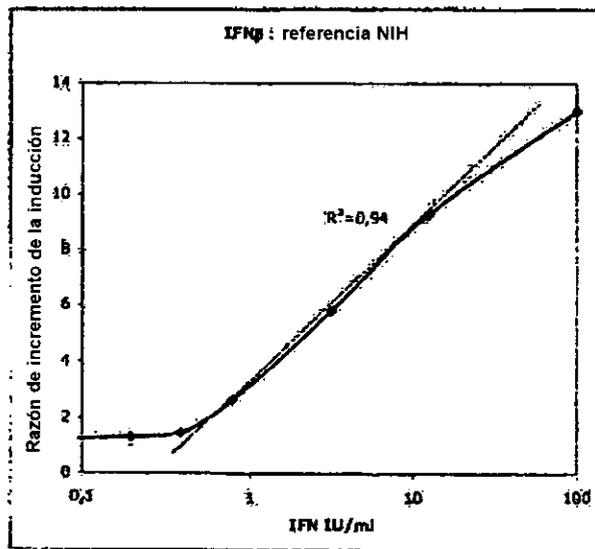


Fig. 4B

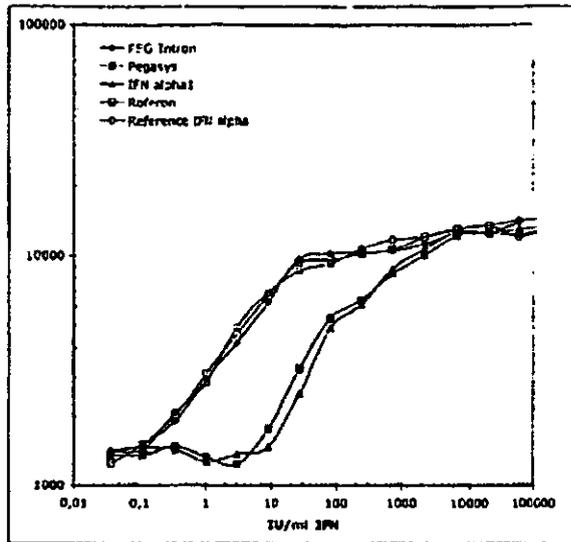


Fig. 5A

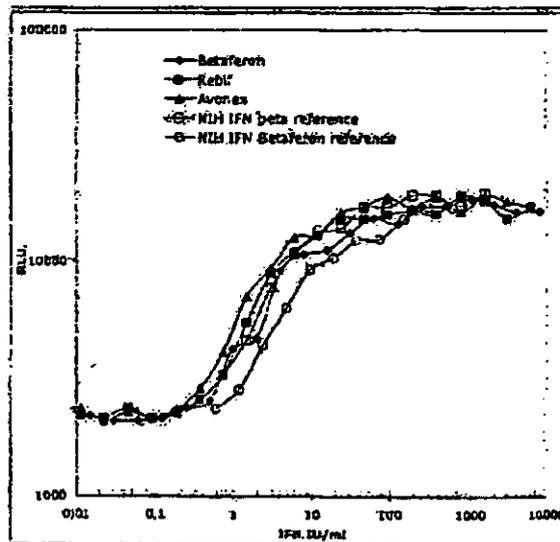


Fig. 5B

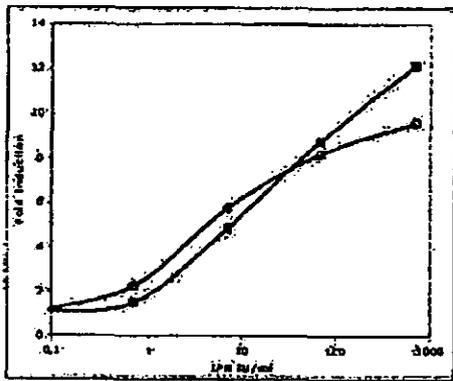


Fig. 6A

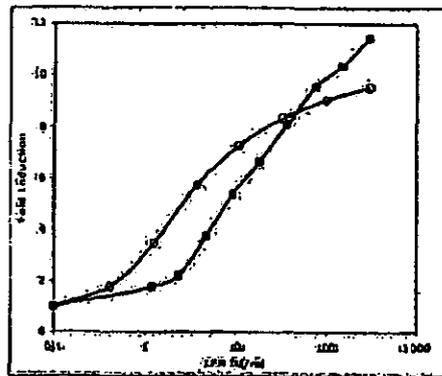


Fig. 6B

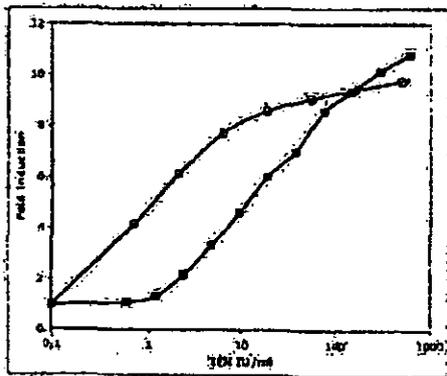


Fig. 6C

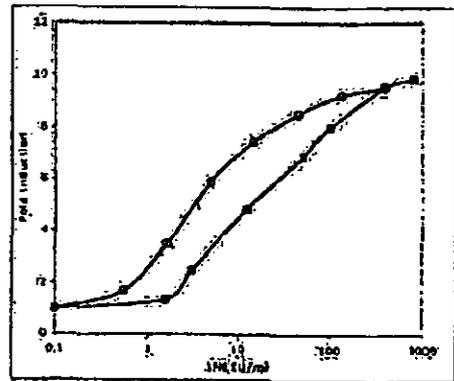


Fig. 6D

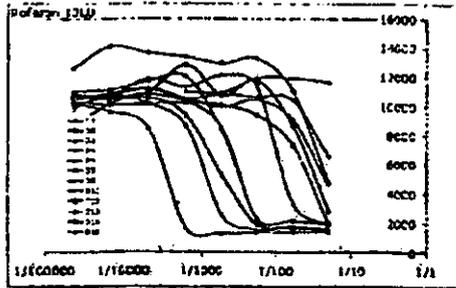


Fig. 7A

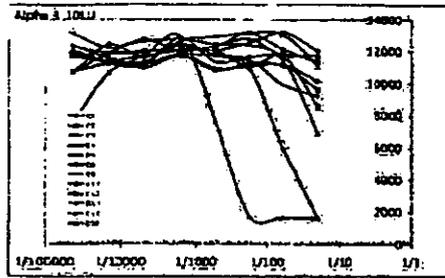


Fig. 7B

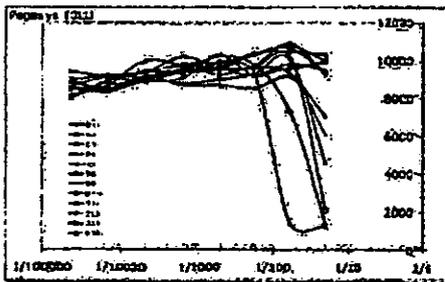


Fig. 7C

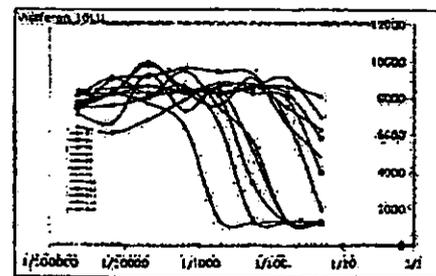


Fig. 7D

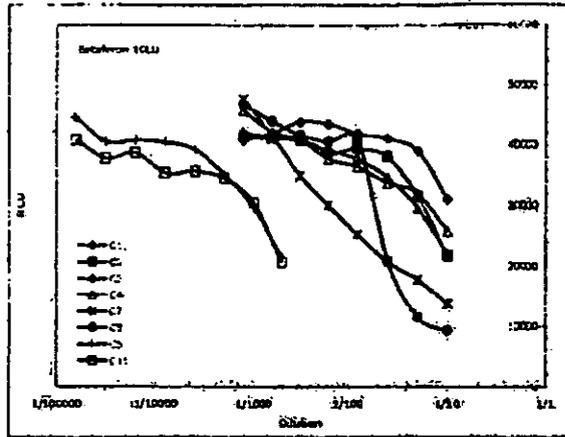


Fig. 8A

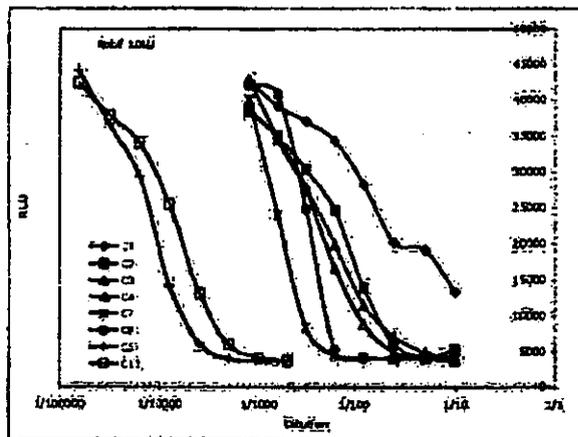


Fig. 8B

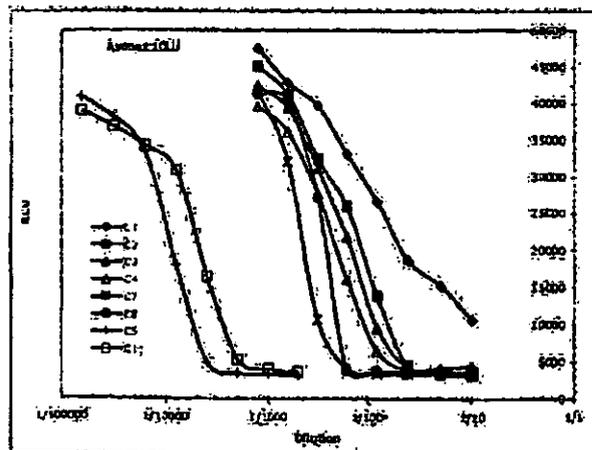


Fig. 8C