

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 122**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2011 E 11702212 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2534480**

54 Título: **Ensayo FACS de ADCC de NK en 3D**

30 Prioridad:

11.02.2010 EP 10153277

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

08.05.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHALLAND, ANDREA;
KLEIN, CHRISTIAN y
KUBBIES, MANFRED**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 459 122 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

Ensayo FACS de ADCC de NK en 3D

5 En el presente documento se describe un novedoso ensayo FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia) de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) basado en un esferoide o en un agregado tridimensional formado por células de linfoma y linfocitos citolíticos naturales. Este ensayo es útil para el análisis funcional *in vitro* de inmunoglobulinas terapéuticas en formato sencillo así como en formato a alto rendimiento.

10 Antecedentes de la invención

Los cultivos monocapa de líneas de células tumorales establecidas se utilizan frecuentemente en la investigación de biología tumoral básica y en el desarrollo de fármacos antitumorales. Sin embargo, un modelo de cultivo plano en dos dimensiones, refleja insuficientemente la arquitectura del tumor en tres dimensiones (3D). Por tanto, aspectos específicos, relacionados con el desarrollo *in vivo* de gradientes de difusión de solutos, solo pueden estudiarse en un sistema de cultivo tridimensional tal como, por ejemplo, el modelo de esferoide o agregado tumoral multicelular. Los esferoides o agregados tumorales imitan regiones tumorales avasculares, caracterizadas por un aporte limitado de nutrientes debido a barreras de difusión a través de capas multicelulares.

20 Sin embargo, en la investigación, el uso extendido de los cultivos en 3D, está limitado por una generación y manipulación inapropiadas. Por tanto, se desarrolló un método sencillo y rápido para generar esferoides o agregados individuales en un cultivo en suspensión en forma de alto rendimiento. En pocillos individuales de una placa de 96 pocillos, en un período de cultivo de 24 horas, pueden generarse esferoides o agregados individuales con tamaños iguales y una geometría esférica homogénea. Se trata de un formato de cultivo estandarizado con fácil acceso para la manipulación de compuestos y la recogida de esferoides para la realización de análisis posteriores. Un tamaño y geometría uniformes garantizan el desarrollo de gradientes de difusión casi idénticos en cada esferoide o agregado (Ivascu, A. and Kubbies, M., J. Biomol. Screening 11 (2006) 922-932). El protocolo de generación de esferoides conocido incluye la adición de un extracto de membrana basal murina (rBM), una mezcla de proteínas de matriz extracelular que induce una compactación del agregado a un esferoide.

30 Inami, K., et al. describen la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-C-ERC/mesotelina *in vivo* (Cancer Sci. 101 (2010) 969-974).

35 Sumario de la invención

Con la combinación de células tumorales y linfocitos citolíticos naturales en un esferoide o agregado tridimensional, se ha descubierto que la evaluación de inmunoglobulinas puede realizarse, por un lado, de forma más parecida al modo *in vivo*, y, por otro lado, que resulta ser adecuada para realizar análisis de alto rendimiento.

40 Un primer aspecto descrito en el presente documento es un método para la detección *in vitro* de la función efectora de un anticuerpo que comprende la etapa de incubar, con la inmunoglobulina, un esferoide o un agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales.

45 En una realización, el método comprende las siguientes etapas:

- a) marcar células diana tumorales con un primer colorante fluorescente,
- b) mezclar linfocitos citolíticos naturales y células diana tumorales,
- 50 c) añadir a un pocillo de una placa multipocillo, aproximadamente 10^4 células por 200 μ l,
- d) centrifugar la placa multipocillo e iniciar así la formación de un esferoide celular tridimensional,
- e) añadir la inmunoglobulina a los pocillos de la placa multipocillo,
- f) incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas,
- g) marcar las células muertas en los pocillos con un segundo colorante fluorescente, y
- 55 i) analizar las células en los pocillos de la placa multipocillo por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y detectar así la función efectora del anticuerpo.

En una realización, los linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales humanos y tienen una pureza del 90% o superior. En una realización adicional, los linfocitos citolíticos naturales y las células diana tumorales se mezclan en una relación de 10:1 a 1:10. En una realización adicional, la relación es de 1:3 a 1:10. En otra realización, la relación es de 1:2 a 1:4. En una realización, la centrifugación se realiza durante 10 min. de 100 a 1.000 rpm. En una realización adicional, la centrifugación se realiza a aproximadamente 1.000 rpm. En una realización, el segundo colorante fluorescente es yoduro de propidio. En una realización, la incubación se realiza durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 28 horas.

65 En una realización, las células tumorales son células de linfoma. En otra realización, la célula de linfoma se selecciona del grupo que comprende células Raji, células SUDHL4, y células Z138. En otra realización, el anticuerpo

se añade al pocillo a una concentración final de 100 µg/ml a 0,001 µg/ml. En una realización adicional, el anticuerpo se añade al pocillo a una concentración final de 20 µg/ml a 0,1 µg/ml. En una realización, el anticuerpo se añade al pocillo a una concentración final de 8 µg/ml a 12 µg/ml.

5 Un aspecto adicional descrito en el presente documento es el uso de un esferoide o agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales para el análisis de alto rendimiento de la combinación de una multitud de anticuerpos y una multitud de células tumorales.

10 Otro aspecto descrito en el presente documento es un método para determinar *in vitro* un anticuerpo con función efectora que comprende:

- a) proporcionar al menos un anticuerpo,
- b) marcar células tumorales con un primer colorante fluorescente,
- c) mezclar linfocitos citolíticos naturales y células diana tumorales,
- 15 d) añadir a los pocillos de una placa multipocillo aproximadamente 10^4 células por 200 µl,
- e) centrifugar la placa multipocillo e iniciar así la formación de un esferoide celular tridimensional,
- f) añadir cada uno de los anticuerpos proporcionados a un pocillo individual de la placa multipocillo,
- g) incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas
- h) marcar las células muertas en cada uno de los pocillos incubados con un segundo colorante fluorescente,
- 20 i) analizar cada pocillo de la placa multipocillo por clasificación de células activadas por fluorescencia, y
- j) determinar el anticuerpo con la mayor relación o con una relación mayor de 1 de células muertas con respecto a células viables como anticuerpo con función efectora.

Así mismo, un aspecto descrito en el presente documento es un kit que comprende:

- 25 a) una célula tumoral marcada con un colorante fluorescente,
- b) linfocitos citolíticos naturales aislados,
- c) una placa multipocillo de 96 pocillos, y
- 30 d) yoduro de propidio.

En una realización, la placa multipocillo es una placa multipocillo de 96 pocillos.

Descripción detallada de la invención

35 En el presente documento se describe una tecnología analítica celular basada en el uso de un ensayo de co-cultivo de esferoides o agregados tridimensional, en el que los esferoides o agregados comprenden células tumorales y linfocitos citolíticos naturales. Este ensayo es útil en una realización para el análisis funcional *in vitro* de inmunoglobulinas en formato sencillo y de alto rendimiento. En una realización, un esferoide o agregado tridimensional sencillo se coloca en cada pocillo de una placa multipocillo de fondo redondo de 96 pocillos que se ha recubierto con poliHEMA, ácido (poli (hidroxietil metacrílico)). En una realización adicional, los linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales (NK, por las siglas en inglés *Natural Killer*) humanos diploides normales. En una realización, los linfocitos NK se han seleccionado aplicando una técnica de selección negativa, es decir, las células no se tocan durante la etapa de la selección (véanse, por ejemplo, Horgan, K. et al., Curr. Prot. Immunol. (2009), capítulo 7, unidad 7.4. Immunomagnetic purification of T cell subpopulations, y Neurauter, A.A., et al., Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 106 (2007) 41-73). Se ha descubierto que, con estos linfocitos NK, es posible cuantificar porcentajes correctos de células viables y muertas.

La mayoría de los experimentos realizados *in vitro* en el campo de la biología tumoral se realizan con cultivos monocapa ya que son fáciles y cómodos de manejar. Sin embargo, aunque proporcionan un modelo valioso para estudiar distintas funciones, los cultivos monocapa no reflejan suficientemente la patobiología tumoral debido a la falta de componentes estromales, matriz extracelular y diferencias geométricas fundamentales entre cultivos bidimensionales (2D) y tumores sólidos tridimensionales (3D). La organización tridimensional de las células proporciona una red de interacciones compleja entre células y entre célula y matriz relevantes, por ejemplo, para la distribución y función de hormonas, factores de crecimiento y nutrientes que influyen en la diferenciación, proliferación y supervivencia celular.

En una realización, el método para la generación de esferoides tridimensionales a partir de agregados comprende la adición, al medio de cultivo, de matriz basal reconstituida, procedente del tumor murino de Englebreth-Holm-Swarm (rBM, Matrigel™), un gel proteínico que contiene componentes de la matriz extracelular, tales como, colágenos, laminina, fibronectina, entactina (nidogen), y proteoglicanos. La arquitectura tridimensional permite el co-cultivo de células tumorales con fibroblastos, células inmunitarias y endoteliales, lo que hace posible la investigación de los efectos de la interacción tumor/estroma *in vitro* (Friedrich, J., et al., Int. J. Radiat. Biol. 83 (2007) 849-871).

En la técnica de centrifugación (Sutherland, R.M. y Durand, R.E., Recent Results Cancer Res. 95 (1984) 24-49) y de rotación giratoria (Moscona, A., Exp. Cell Res. 22 (1961) 455-475) se colocan células tripsinizadas en un recipiente de cultivo con un agitador magnético que inhibe la fijación de la célula al substrato y favorece la adhesión entre

células. En una técnica desarrollada más recientemente, los esferoides crecen en una gota colgante de una microplaca invertida (Kelm, J.M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 173-180). Sin embargo, todos estos métodos están limitados por un largo tiempo de cultivo, por la formación de esferoides de tamaño desigual, o por una difícil accesibilidad mecánica. Además, en cultivos de suspensión, muchas líneas celulares tumorales crecen mal en esferoides compactos tridimensionales (Mueller Klieser, W., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36 (2000) 123-139).

El uso de esferoides o agregados en un modo a alto rendimiento en la investigación requiere un protocolo estandarizado que genere rápidamente esferoides de tamaño homogéneo con gradientes de difusión y fisiología celular similares en un formato de placa multipocillo que sea fácilmente accesible para análisis bioquímicos o celulares posteriores. Además, dicho protocolo debe ser aplicable a una gran variedad de líneas celulares tumorales.

Se ha descubierto que esta necesidad puede satisfacerse con los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, un aspecto descrito en el presente documento es un ensayo para la detección de la función efectora de un anticuerpo que comprende:

- a) marcar células de linfoma (diana) con el fluoróforo verde CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína),
- b) aislar linfocitos citolíticos naturales (NK) normales humanos de sangre humana, en una realización con una pureza superior al 90%,
- c) mezclar los NK y las células de linfoma diana en una relación de 1:10 a 10:1,
- d) añadir a algunos o a todos los pocillos de una placa multipocillo, aproximadamente 10^4 células por 200 μ l,
- e) centrifugar la placa multipocillo,
- f) añadir a los pocillos de la placa multipocillo la inmunoglobulina de interés,
- g) incubar la placa multipocillo durante hasta 72 h, en una realización durante 20 h a 72 h,
- h) añadir yoduro de propidio a los pocillos, y
- i) analizar por FACS las células en los pocillos de la placa multipocillo.

Se ha descubierto que, mediante la combinación de células de linfoma y linfocitos citolíticos naturales, se puede proporcionar un ensayo sensible de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En una realización, la detección de la función efectora de un anticuerpo es una detección o determinación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de un anticuerpo. También es beneficiosa una configuración de ensayo tridimensional de células tumorales y de función inmunoefectora. En una realización, los métodos descritos en el presente documento son métodos *in vitro*. En otra realización, la mezcla de las células tumorales y los linfocitos citolíticos naturales da lugar a la formación de un esferoide tridimensional. En las Figuras 1 y 2 se muestra la distribución de células viables y muertas analizadas por FACS. La Figura 1a muestra la distribución de células Raji viables y muertas marcadas con CMFDA determinada por análisis FACS. Las células Raji viables están situadas en el sector inferior derecho del diagrama FACS. Las Figuras 1b y 1c muestran la distribución de células viables y muertas de un co-cultivo de células Raji y linfocitos citolíticos naturales en ausencia de un anticuerpo añadido. Los linfocitos citolíticos naturales viables están situados en el sector inferior izquierdo del diagrama FACS, las células Raji viables están situadas en el sector inferior derecho del diagrama FACS, los linfocitos citolíticos naturales muertos están situados en el sector superior izquierdo del diagrama FACS y las células Raji muertas están situadas en el sector superior derecho del diagrama FACS. En las Figuras 1b (relación de células Raji con respecto a linfocitos citolíticos naturales de 1:1) y 1c (relación de células Raji con respecto a linfocitos citolíticos naturales de 1:10) puede observarse que, en ausencia de anticuerpo e independientemente de la relación de células Raji con respecto a linfocitos citolíticos naturales, el porcentaje de las respectivas células de linfoma viables y muertas no ha cambiado significativamente.

La Figura 2a muestra el análisis FACS de células Raji viables y muertas después de la incubación con un anticuerpo. En comparación con el diagrama FACS de la Figura 1a, puede observarse que, incubando las células Raji solo con el anticuerpo, la fracción de células muertas aumenta debido a la función inductora de muerte celular directa del anticuerpo. En presencia de linfocitos NK, el número de células Raji muertas aumenta incluso más debido a la función efectora de la ADCC (grupos de arriba a la derecha: Figura 2b relación Raji/NK de 1:1 y Figura 2c relación Raji/NK de 1:10). Puede observarse que, mediante la adición de linfocitos citolíticos naturales, la sensibilidad del ensayo puede aumentar.

En el ensayo, las placas multipocillo se centrifugan en una realización durante 10 min. a 1.000 g. Durante la centrifugación todas las células dentro de cada pocillo se sedimentan en el fondo del pocillo. Esto garantiza números de células iguales para el inicio de la formación de un esferoide o agregado sencillo en cada pocillo.

En la Figura 3 se muestra el efecto en el ensayo de la secuencia de la adición de los componentes individuales, es decir, células Raji, linfocitos citolíticos naturales y anticuerpo. Puede observarse que la adición de los tres componentes en paralelo dio lugar a tasas de muerte celular ligeramente, pero no significativamente, superiores. Sin embargo, para imitar más fielmente la situación *in vivo*, en una realización el ensayo comprende la formación de los agregados o esferoide tridimensional de NK - linfoma antes de la adición del anticuerpo objeto de ensayo.

El ensayo descrito en el presente documento puede realizarse con cualquier célula tumoral (diana). En una realización, la célula tumoral es una célula de linfoma. En otra realización, la célula de linfoma se selecciona de célula Raji, célula SUDHL4 y célula Z138.

5 En una realización, al utilizar células tumorales de carcinoma o sarcoma que crecen de forma adherente como células tumorales, la formación del esferoide tridimensional se realiza en presencia de membrana basal reconstituida (rBM) líquida. En una realización, se utiliza una concentración de rBM del 2,5% (v/v). En esta realización, todas las células se incorporaron en un esferoide distinto con una geometría redonda. La formación y compactación finalizó tras 24 horas de tiempo de cultivo. Por lo tanto, en una realización la incubación se realiza durante 20 horas a 28
10 horas. Concentraciones más bajas de rBM no garantizaron la incorporación de todas las células en el esferoide, y concentraciones más altas alteraron la geometría redonda de los esferoides. Después de la etapa de centrifugación de 10 min., todas las células dentro de un pocillo se incorporan en un sedimento plano. Tres horas más tarde, empieza a ser evidente cierto grado de compactación en presencia y en ausencia de rBM. Sin rBM, no puede observarse tensionamiento adicional de los agregados después de 6 horas y 24 horas. En una realización, la célula tumoral es una célula Raji y en todas las etapas del método la rBM está ausente.

En una realización, se centrifugaron cinco mil células en RPMI 1640 con FCS (suero fetal de ternero) al 10% y rBM al 2,5% (v/v). El tamaño del esferoide se analizó después de un período de cultivo 24 horas. Todos los esferoides tienen forma regular, presentan una geometría redonda uniforme, y muestran variación de tamaño limitada.

20 En la Figura 4, el ensayo descrito en el presente documento se realiza con diferentes líneas celulares tumorales (diana) de linfoma y con diferentes concentraciones de anticuerpo. Puede observarse que el ensayo descrito en el presente documento puede realizarse con diferentes líneas celulares de linfoma con la misma eficiencia. Así mismo, puede observarse que el ensayo puede realizarse a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml a 0,1 µg/ml. Por tanto, en una realización el ensayo descrito en el presente documento comprende añadir el anticuerpo a una concentración de 0,1 µg/ml a 15 µg/ml, en una realización adicional de 8 µg/ml a 12 µg/ml.

En la Figura 5 se muestra la sensibilidad del ensayo descrito en el presente documento dependiendo de la relación de células de linfoma con respecto a linfocitos citolíticos naturales. Puede observarse que una relación de 1:1 a 1:10 de células (diana) de linfoma con respecto a linfocitos citolíticos naturales indica la función efectora de ADCC de los linfocitos NK. Por lo tanto, en una realización la relación de célula de linfoma con respecto a linfocito citolítico natural es de 1:1 a 1:10, en otra realización es de 1:3 a 1:10, en una realización adicional es de 1:2 a 1:4.

35 Con el ensayo descrito en el presente documento pueden generarse esferoides o agregados tridimensionales sencillos con una distribución de tamaño limitada y una geometría esférica homogénea en un solo pocillo o en múltiples pocillos de una placa multipocillo en paralelo en un período de cultivo de 24 horas. Se ha demostrado que éste puede ser un formato de cultivo estandarizado con fácil acceso para la manipulación de compuestos y la recogida de esferoides para análisis posteriores. El tamaño y la geometría casi uniformes de los esferoides o agregados garantizan el desarrollo de gradientes de difusión similares en cada esferoide. Por lo tanto, un aspecto descrito en el presente documento es un ensayo automatizado o a alto rendimiento que comprende el ensayo expuesto anteriormente. El protocolo de generación de esferoides incluye la adición de un extracto de membrana basal murina (rBM), una mezcla de proteínas de matriz extracelular que induce una compactación del agregado a un esferoide.

45 La Figura 6 muestra un esquema ilustrativo de la generación de esferoides tridimensionales.

En el presente documento se describe un método para la detección *in vitro* de la función efectora de un anticuerpo que comprende la incubación de un esferoide o agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales con el anticuerpo.

50 En una realización, el método comprende las siguientes etapas:

- mezclar linfocitos citolíticos naturales y células tumorales,
- añadir a los pocillos de una placa multipocillo aproximadamente 10^4 células por 200 µl,
- 55 - centrifugar la placa multipocillo e inducir así la formación de un esferoide o agregado tridimensional,
- añadir la inmunoglobulina a los pocillos de la placa multipocillo,
- incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas, y
- analizar las células en los pocillos de la placa multipocillo por clasificación de células activadas por fluorescencia y detectar así la función efectora del anticuerpo.

60 En una realización adicional, el método comprende además, como primera etapa, la siguiente etapa:

- marcar células tumorales con un primer colorante fluorescente.

65 En otra realización, el método comprende las etapas adicionales de:

- marcar células muertas con un segundo colorante fluorescente,
y
- analizar las células en los pocillos de la placa multipocillo por clasificación de células activadas por fluorescencia y detectar así la función efectora del anticuerpo.

5 En una realización, los linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales humanos. Así mismo, en una realización los linfocitos citolíticos naturales y las células tumorales se mezclan en una relación de 10:1 a 1:10. En una realización adicional, la relación es de 1:2 a 1:4.

10 En una realización, la incubación se realiza durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 28 horas.

En una realización, la centrifugación se realiza a 1.000 rpm durante 10 min.

15 En una realización, la célula tumoral es una célula de linfoma. En una realización adicional, la célula de linfoma es una célula Raji, o una célula SUDHL4, o una célula Z138.

En una realización, el anticuerpo se añade a una concentración de 15 µg/ml a 0,1 µg/ml. En otra realización, el anticuerpo se añade a una concentración de 8 µg/ml a 12 µg/ml.

20 Otro aspecto descrito en el presente documento es el uso de un esferoide o agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales para la determinación de la función efectora de una combinación de una multitud de anticuerpos con una multitud de células tumorales.

25 Un aspecto adicional descrito en el presente documento es un método para determinar *in vitro* un anticuerpo con función efectora que comprende las etapas de:

- mezclar linfocitos citolíticos naturales y las células tumorales,
- añadir a los pocillos de una placa multipocillo aproximadamente 10^4 células por 200 µl,
- centrifugar la placa multipocillo e inducir así la formación de un esferoide o agregado celular tridimensional,
- 30 - añadir el anticuerpo a un pocillo individual de la placa multipocillo,
- incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas, y
- determinar el anticuerpo con una relación de células muertas con respecto a viables como anticuerpo con función efectora.

35 En una realización, el método comprende además las primeras etapas siguientes:

- proporcionar al menos un anticuerpo, y
- marcar células tumorales con un primer colorante fluorescente.

40 En otra realización, el método comprende las etapas de:

- añadir, a un pocillo individual de la placa multipocillo, cada uno de los anticuerpos proporcionados, por lo que a cada pocillo se añade como máximo un anticuerpo,
- marcar las células muertas en cada uno de los pocillos incubados con un segundo colorante fluorescente,
- 45 - analizar las células, en cada pocillo de la placa multipocillo, por clasificación de células activadas por fluorescencia, y
- determinar el anticuerpo con la relación más alta de células muertas con respecto a viables como anticuerpo con función efectora.

50 El ensayo y método descrito en el presente documento se ilustra con un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento WO 2005/044859 (incorporado por referencia en el presente documento). Este anticuerpo solo se ha seleccionado para ilustrar la presente invención y no debe interpretarse como limitante. El alcance de la invención se expone en las reivindicaciones.

55 Los siguientes ejemplos y figuras se facilitan para ayudar a comprender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse de la esencia de la invención.

Descripción de las Figuras

60 Figura 1 Análisis FACS de células Raji viables y muertas y de linfocitos citolíticos naturales (NK) en ausencia de un anticuerpo. Cuadrantes: inferior izquierdo: linfocitos NK viables, superior izquierdo: linfocitos NK muertos, inferior derecho: células Raji viables, superior derecho: células Raji muertas. Panel A: células Raji solamente, panel B: células Raji y linfocitos NK en una relación de 1:1, panel C: células Raji y linfocitos NK en una relación de 1:10.

65

- Figura 2 Análisis FACS de células Raji viables y muertas y linfocitos citotóxicos naturales en presencia de un anticuerpo anti-CD20 añadido (10 µg/ml). Cuadrantes: inferior izquierdo: linfocitos NK viables, superior izquierdo: linfocitos NK muertos, inferior derecho: células Raji viables, superior derecho: células Raji muertas. Panel A: células Raji solamente, panel B: células Raji y linfocitos NK en una relación de 1:1, panel C: células Raji y linfocitos NK en una relación de 1:10.
- Figura 3 Optimización del co-cultivo linfoma/esferoide-agregado por variación del esquema de aplicación de células de linfoma, linfocitos NK y anticuerpos. Células de linfoma: células Raji.
- Figura 4 Porcentajes de células de linfoma viables en presencia de linfocitos NK como una función de la concentración del anticuerpo anti-CD20. Panel A: células Raji, panel B: células SUDHL4, panel C: células Z138. Relación de linfocitos NK con respecto a células de linfoma (relación E: D) de 3:1.
- Figura 5 Porcentajes de células de linfoma viables en presencia de la concentración de anticuerpos anti-CD20 como una función de la relación entre efector (NK): diana (linfoma). Panel A: células Raji, panel B: células SUDHL4, panel C: células Z138. Concentración de anticuerpos anti-CD20: 10 µg/ml.
- Figura 6 Método ilustrativo, esquemático.
- Figura 7 Imágenes microscópicas de células Raji solamente y células Raji co-cultivadas con linfocitos NK purificados.

Ejemplo 1

Material y Métodos

Líneas de células:

Se obtuvieron líneas de células Raji, células SU-DHL4 y células Z138 de la ATCC (Manassas, VA, Estados Unidos), del DSMZ (Braunschweig, Alemania) y del Prof. M. Dyer (Universidad de Leicester, RU), respectivamente. Las células Raji y las células SU-DHL4 se cultivaron en medio RPMI 1640 (PAN Biotech, Cat. no. P04-18500) y las Z138 en medio DMEM (PAN Biotech, Cat. no. P04-02500) complementado con FCS al 10% (Gibco, Cat. no. 10500-064) y Pen/ Strep (Roche, Cat. no. 11 074 440 001) a 37°C en una incubadora humidificada. Para los experimentos de co-cultivo de linfocitos NK se utilizaron células de crecimiento exponencial con una viabilidad celular del 90% o superior.

Purificación de linfocitos NK:

Se extrajo sangre completa de donantes sanos normales a tubos vacutainer (Becton Dickinson, Cat. no. 368484). Las PBMC se obtuvieron por preparación de Ficoll (PAN Biotech Cat. no. P04-60125). Para dejar intactos los linfocitos NK, estos se purificaron utilizando un kit de selección negativa de linfocitos NK (Miltenyi, Cat. no. 130-092-657). En resumen, las PBMC aisladas en Ficoll volvieron a suspenderse en tampón MACS (PBS/BSA al 0,5%/ EDTA 2 mM) a 1×10^7 células/40 µl. A las células se añadieron 10 µl de un cóctel de Linfocitos NK-Biotina-Anticuerpo y se incubó durante 10 min. a 4°C, seguido de la adición de 30 µl del tampón MACS. Después de esto, a las células se añadieron 20 µl del cóctel de Linfocitos-NK-Microperlas y se incubó durante 15 min. a 4°C. Se añadieron 2 ml de tampón MACS y las células se centrifugaron durante 10 min. a 300 g. El sedimento volvió a suspenderse en 500 µl de tampón MACS y se cargó en la columna de separación, previamente equilibrada con 500 µl de tampón MACS. Posteriormente, la columna se lavó tres veces con 500 µl de tampón MACS y el número de células se determinó en el eluato total utilizando el Contador de Células CASY (Sistema Schärfe).

La pureza de la preparación de linfocitos NK se determinó tiñendo una parte alícuota del eluato MACS. En resumen, aproximadamente 2×10^5 células volvieron a suspenderse en 100 µl de RPMI 1640/FCS al 10% y se tiñeron con 10 µl de cada uno de los anticuerpos anti-CD56-PE y anti-CD3-FITC (Becton Dickinson, Cat. no. 555516 y 555339, respectivamente) durante 15 min. a 4°C. Posteriormente, se añadieron 2 ml de RPMI 1640/FCS al 10% a las células que se centrifugaron durante 5 min. a 400 g. El sedimento volvió a suspenderse en 0,5 ml de RPMI 1640/FCS al 10% y utilizando un Escáner FACS o un instrumento FACS Canto II (Becton Dickinson), se analizó el porcentaje de la fracción celular positiva a CD56, pero negativa a CD3, en la entrada de dispersión de linfocitos.

Purificación de monocitos:

Se extrajo sangre completa de donantes sanos normales a tubos vacutainer (Becton Dickinson, Cat. no. 368484). Las PBMC se obtuvieron por preparación de Ficoll (PAN Biotech Cat. no. P04-60125). Para dejar intactos los monocitos, estos se purificaron utilizando un kit de selección negativa de enriquecimiento de monocitos (Stem Cell Technologies, Cat No.: 19059).

Tinción de células de linfoma con CMFDA:

El liofilizado de CMFDA (Invitrogen Cat. no. C7025) volvió a suspenderse en DMSO para obtener una solución madre de 10 mM. Se incubaron 1×10^6 células de linfoma durante 30 min. a 37°C en 1 ml de medio completo

complementado con CMFDA 1 μ M. Después de esto, las células se sedimentaron, se lavaron una vez en medio completo y volvieron a suspenderse finalmente en medio completo a 1×10^6 de células/ml.

Ejemplo 2

5

Generación de esferoides/agregados en 3D a partir de líneas de células de linfoma

El número de células de linfoma se determinó utilizando un instrumento CASY (Sistemas Schärfe, Reutlingen) y la suspensión celular se diluyó en medio enfriado con hielo a $2,5 \times 10^4$ células/ml (para 5.000 células por esferoide/agregado) y 5×10^4 células/ml (para 10.000 células por esferoide/agregado). Se añadió un volumen de 200 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Coming Inc., Nueva York, Estados Unidos) o cónico (Nunc, Roskilde, Países Bajos). Para prevenir la fijación de las células, las placas se recubrieron previamente con 50 μ l de poliHEMA al 0,5% (Polysciences, Eppelheim, Alemania) en etanol al 95% (v/v) y se secaron al aire a 37°C durante tres días. La formación de esferoides se inició por centrifugación de las placas a 1.000 g durante 10 min. utilizando una centrífuga Eppendorf 5810 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) con cubos oscilantes. Las placas se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar a 37°C y con CO₂ al 7% en incubadoras humidificadas.

Ejemplo 3

20

Generación de esferoides/ agregados en 3D a partir de líneas de células de tumores sólidos

Se separaron células monocapa con Accutase (PAA Laboratories GmbH, Innsbruck, Austria) para generar una suspensión celular sencilla. El número de células se determinó utilizando un instrumento CASY (Sistemas Schärfe, Reutlingen) y la suspensión celular se diluyó en medio enfriado con hielo a $2,5 \times 10^4$ células/ml (para 5.000 células por esferoide/agregado) y 5×10^4 células/ml (para 10.000 células por esferoide/agregado). La rBM se descongeló en hielo durante una noche y se añadió a la suspensión celular a una concentración final de 2,5% (v/v) con puntas de pipeta enfriadas con hielo. Se añadió un volumen de 200 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Coming Inc., Nueva York, Estados Unidos) o cónico (Nunc, Roskilde, Países Bajos). Para prevenir la fijación de las células, las placas se recubrieron previamente con 50 μ l de poliHEMA al 0,5% (Polysciences, Eppelheim, Alemania) en etanol al 95% y se secaron al aire a 37°C durante tres días. La formación de esferoides se inició por centrifugación de las placas a 1.000 g durante 10 min. utilizando una centrífuga Eppendorf 5810 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) con cubos oscilantes. Las placas se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar a 37°C y con CO₂ al 7% en incubadoras humidificadas.

35

Ejemplo 4

Co-cultivo de esferoides/agregados linfoma/NK e incubación con anticuerpo

La secuencia del co-cultivo celular y la adición de anticuerpos pueden modificarse. En un experimento de co-cultivo ilustrativo, se mezclaron células del linfoma (marcadas con CMFDA) y linfocitos NK en las relaciones indicadas en placas de 6 pocillos. Por ejemplo, una relación E: D (linfocitos NK con respecto a células de linfoma) de 3:1 corresponde a una mezcla celular de 3+1 (por ejemplo, 75% de linfocitos NK y 25% de células de linfoma). Se añadieron 200 μ l de la suspensión celular a un solo pocillo de una placa con fondo en V de 96 pocillos recubierta con poliHEMA (Nunc, Cat. no. 249662). Recubrimiento de poliHEMA: 50 μ l de poliHEMA al 0,5% en etanol al 95% por pocillo; secado durante 72 h a 37°C (Polysciences, Cat. No. 18894). Las placas se centrifugaron durante 10 min. a 1.000 g. Después de esto, los anticuerpos se añadieron en las concentraciones indicadas anteriormente, y los agregados/esferoides celulares se incubaron a 37°C, CO₂ al 7% en una incubadora humidificada. En la Figura 7 se muestran imágenes microscópicas de células Raji en solitario y de células Raji co-cultivadas con linfocitos NK purificados, así como imágenes de células Raji y monocitos co-cultivados para ilustrar el co-cultivo en 3D de células tumorales con otras células inmunitarias, además de linfocitos NK.

50

Ejemplo 5

55 Análisis de células viables y muerte celular

Se generaron esferoides/agregados utilizando 10.000 células y se incubaron con el anticuerpo como se explica en los Ejemplos 2 y 3. La identificación de células tumorales de linfoma viables se realizó de la siguiente manera: se agruparon agregados individuales de pocillos individuales que representaban las mismas condiciones experimentales, se disociaron mediante pipeteado y se centrifugaron a 300 g durante 10 min. Se agruparon esferoides individuales, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS), volvieron a suspenderse en solución Accutase, y se incubaron a 37°C. Cada cinco minutos, los esferoides/agregados volvieron a suspenderse mediante pipeteado y la disociación se completó en un intervalo de 5 a 15 min. Las células se lavaron utilizando medio completo, se centrifugaron y los sedimentos celulares volvieron a suspenderse en medio

60

completo y se añadió yoduro de propidio a una concentración de 1 µg/ml (Sigma, Cat. no. P4170). Se realizó un análisis de fluorescencia por análisis FACS (Becton Dickinson, instrumento Canto II).

5 Se identificaron células de linfoma viables tal como se muestra en la Figura 1b. El cuadrante superior derecho de células positivas a PI y CMFDA representa las células de linfoma muertas, y el cuadrante inferior derecho de células negativas a PI, pero positivas a CMFDA, representa la fracción de células diana de tumor de linfoma viable. En el cuadrante inferior izquierdo aparecen los linfocitos NK viables, mientras que los linfocitos NK muertos aparecen en el cuadrante superior izquierdo.

10 En un escenario alternativo puede realizarse un ensayo de apoptosis. Se generaron esferoides/agregados utilizando 10.000 células y se incubaron con el anticuerpo como se explica en los Ejemplos 2 y 3. Para un análisis de apoptosis, los esferoides/agregados se transfirieron a una placa de fondo cónico de 96 pocillos, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS), volvieron a suspenderse en solución Accutase y se incubaron a 37°C. Cada cinco minutos, los esferoides/agregados volvieron a suspenderse mediante pipeteado y la disociación se completó en un intervalo de 5 a 15 min. Las suspensiones celulares sencillas de ocho esferoides/agregados se agruparon y las células se tiñeron con anexina-V-fluos y yoduro de propidio (PI) en presencia de CaCl₂ 2 mM complementado, (kit de tinción de anexina-V-fluos, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La fluorescencia de 10.000 células se obtuvo utilizando un citómetro de flujo (instrumento de escáner FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos). En las gráficas de puntos se aplicó estadística de cuadrantes, situándose el número de células viables en el cuadrante inferior izquierdo.

20 Para obtener el número absoluto de células muertas y viables, se realizó un recuento del número de células totales de los esferoides/agregados utilizando una cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y se multiplicó por el porcentaje de células viables o muertas de los mismos esferoides/agregados determinados a partir de la tinción con anexina-V-fluos/PI.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección *in vitro* de la función efectora de un anticuerpo, que comprende la incubación de un esferoide o agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales con el anticuerpo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) mezclar linfocitos citolíticos naturales y células tumorales,
 b) añadir aproximadamente 10^4 células por 200 μ l a los pocillos de una placa multipocillo,
 c) centrifugar la placa multipocillo e inducir así la formación de un esferoide o agregado tridimensional,
 d) añadir el anticuerpo a los pocillos de la placa multipocillo,
 e) incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas,
 15 f) analizar las células en los pocillos de la placa multipocillo por clasificación de células activadas por fluorescencia y detectar así la función efectora del anticuerpo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que los linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales humanos.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los linfocitos citolíticos naturales y las células tumorales se mezclan en una relación de 10:1 a 1:10.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la relación es de 1:2 a 1:4.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la incubación se realiza durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 28 horas.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizado por que la centrifugación se realiza a 1.000 rpm durante 10 min.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la célula tumoral es una célula de linfoma.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la célula de linfoma es una célula Raji o una célula SU-DHL4 o una célula Z138.
- 35 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, caracterizado por que el anticuerpo se añade a una concentración de 15 μ g/ml a 0,1 μ g/ml.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que el anticuerpo se añade a una concentración de 8 μ g/ml a 12 μ g/ml.
12. El uso de un esferoide o agregado tridimensional que comprende células tumorales y linfocitos citolíticos naturales para la determinación de la función efectora de una combinación de una multitud de anticuerpos con una multitud de células tumorales.
- 45 13. Un método para determinar *in vitro* un anticuerpo con función efectora que comprende
- 50 a) mezclar linfocitos citolíticos naturales y células tumorales,
 b) añadir aproximadamente 10^4 células por 200 μ l a los pocillos de una placa multipocillo,
 c) centrifugar la placa multipocillo e inducir así la formación de un esferoide o agregado tridimensional,
 d) añadir cada uno de los anticuerpos proporcionados a un pocillo individual de la placa multipocillo,
 e) incubar la placa multipocillo durante aproximadamente 20 horas a aproximadamente 72 horas, y
 55 f) determinar el anticuerpo con una relación de más de 1 célula muerta con respecto a células viables como anticuerpo con función efectora.
14. Un kit que comprende:
- 60 a) una célula tumoral marcada con un colorante fluorescente,
 b) linfocitos citolíticos naturales aislados,
 c) una placa multipocillo de 96 pocillos, y
 d) yoduro de propidio.

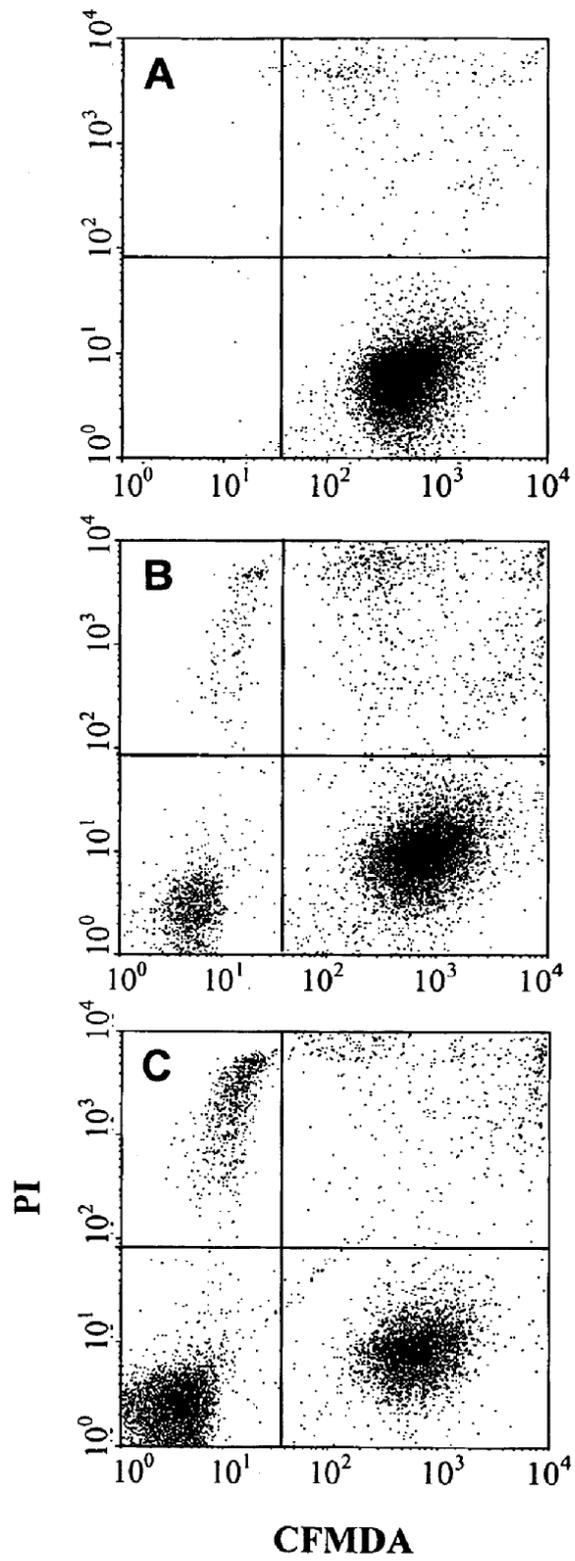


Fig. 1

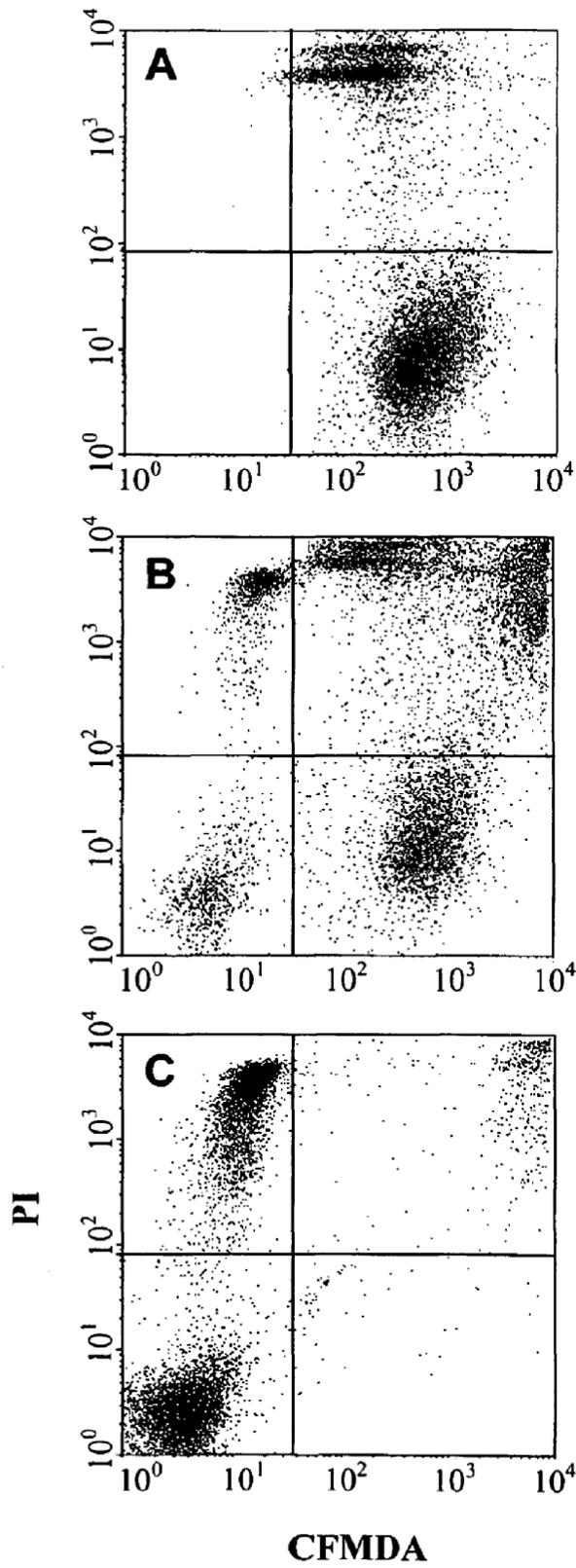


Fig. 2

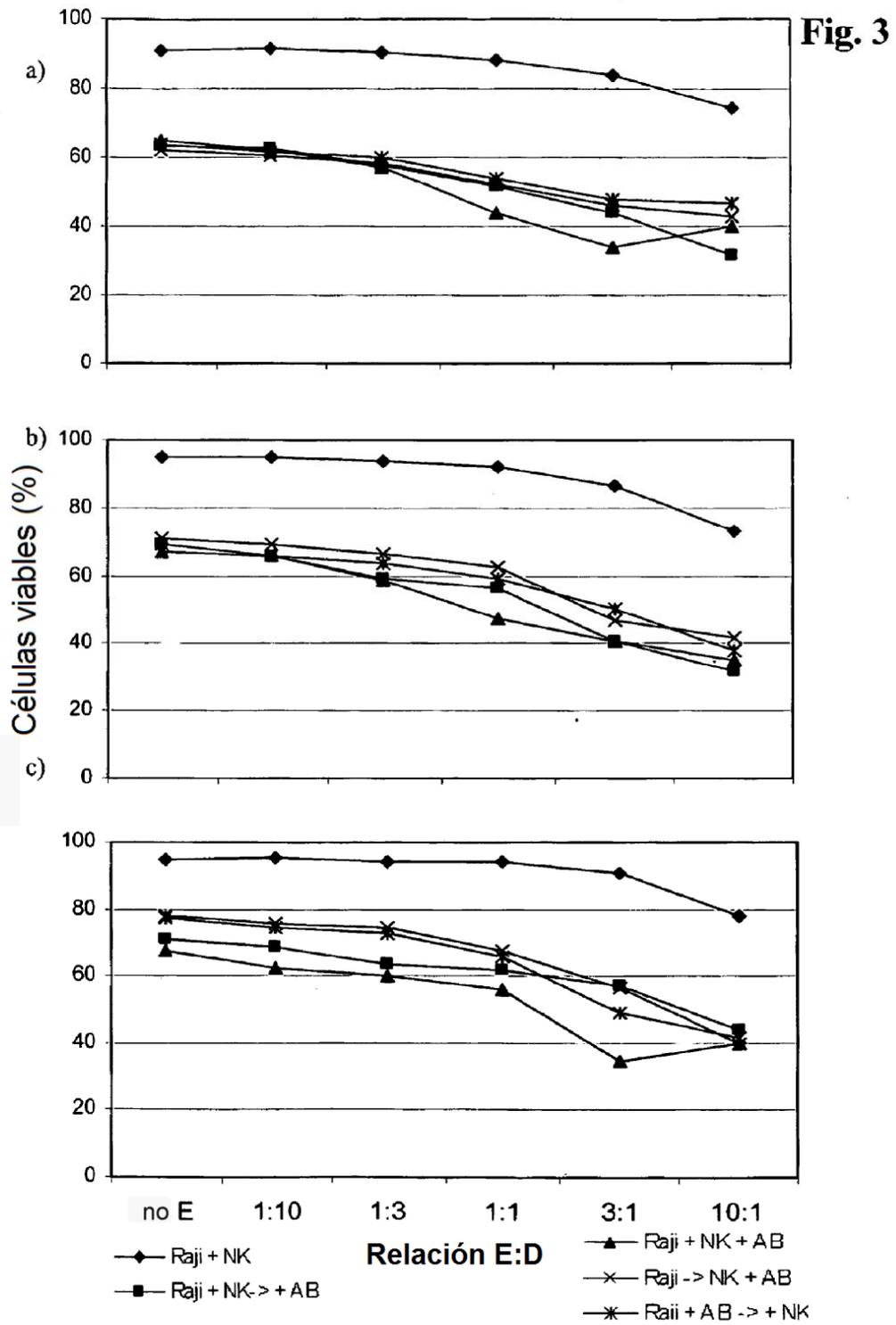


Fig. 4

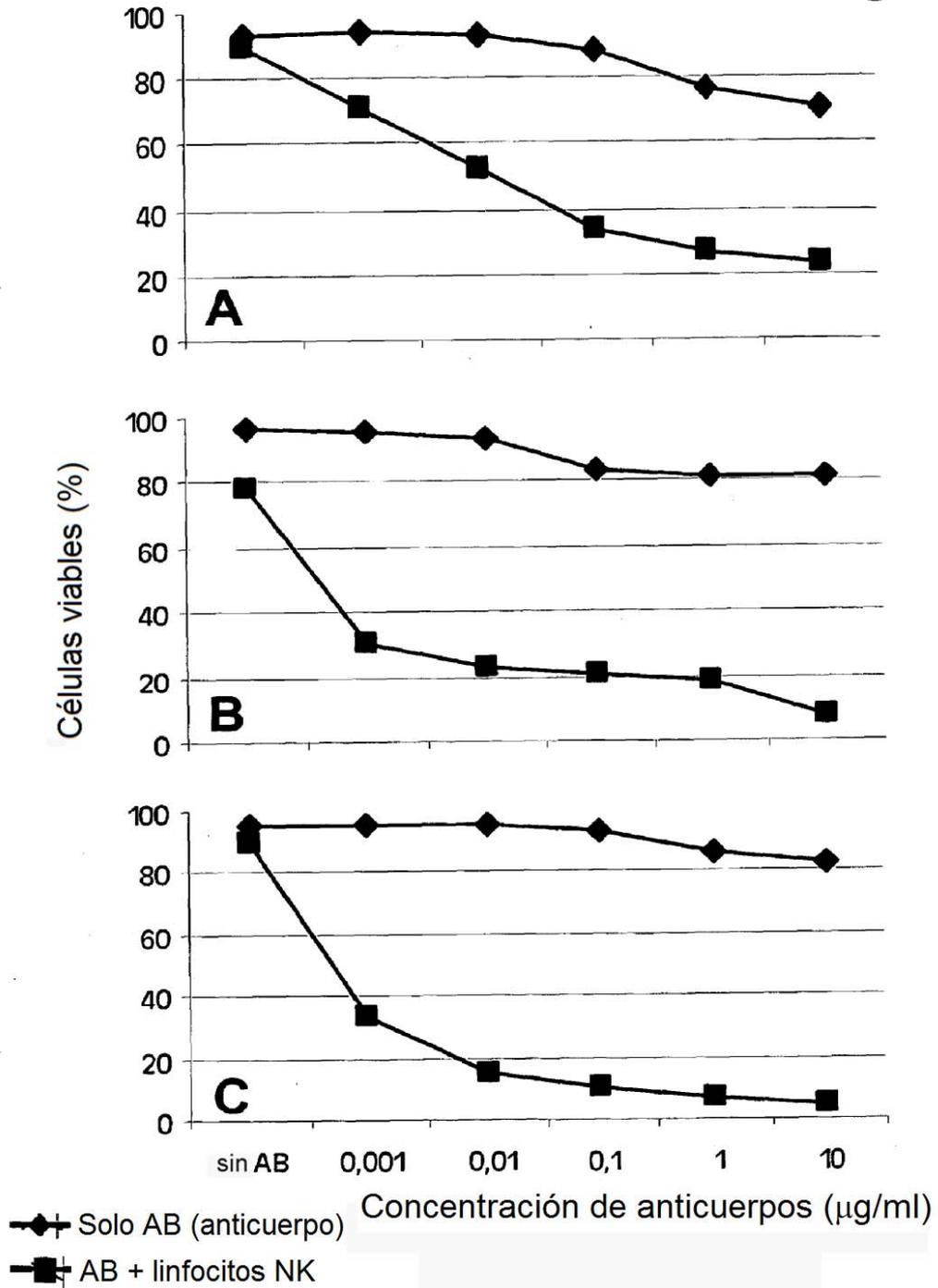


Fig. 5

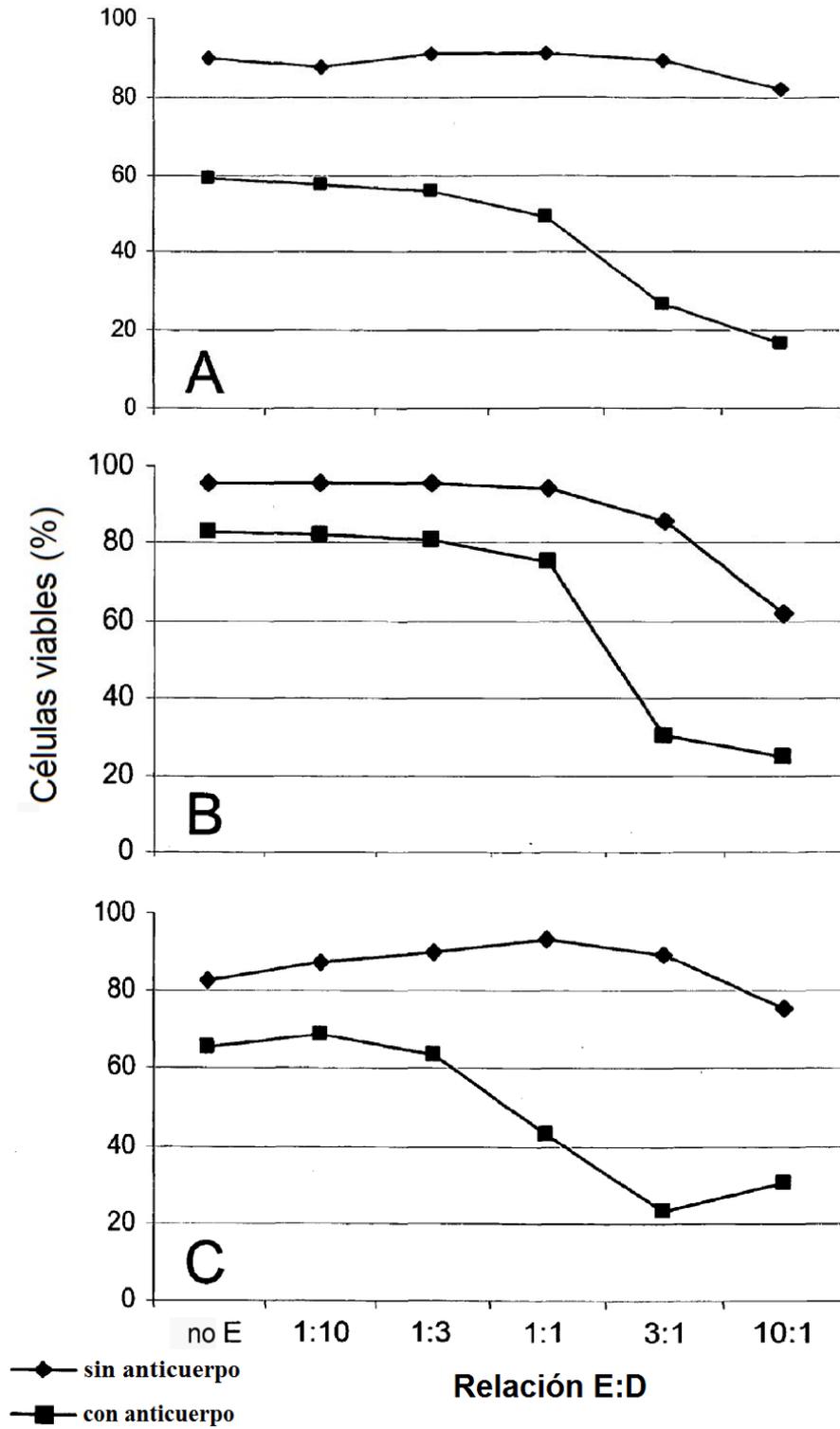


Fig. 6

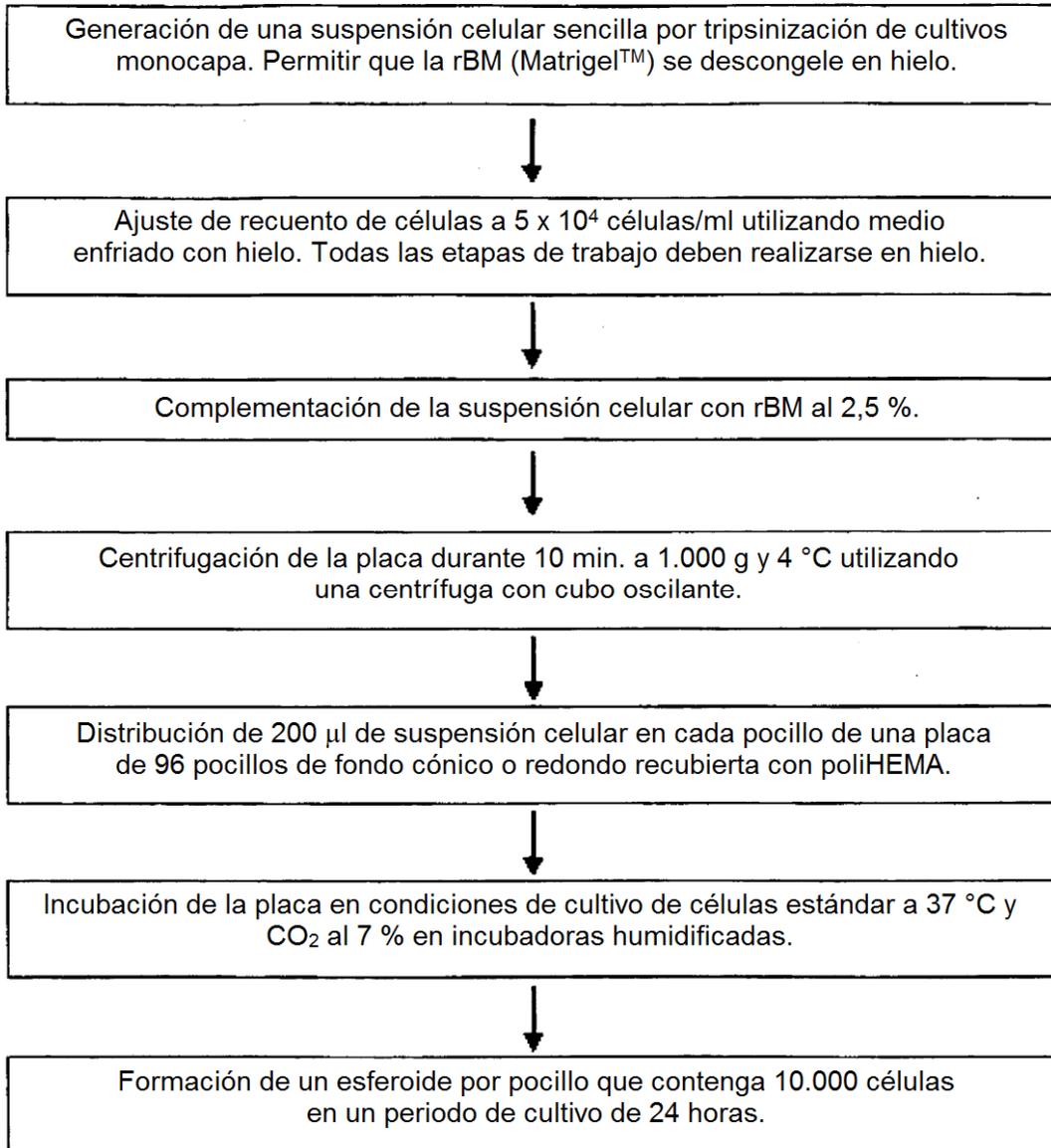


Fig. 7

