

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 381**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2009 E 09718276 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2262905**

54 Título: **Ensayo con gen indicador, las células y el kit para realizar dicho ensayo**

30 Prioridad:

04.03.2008 US 33621 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (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 2 543 381 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

[0001] Esta solicitud reivindica el derecho de prioridad de la solicitud provisional U.S. Nº 61/033,621, presentada el 4 de marzo de 2008.

Sector de la técnica

[0002] La presente invención se refiere a un ensayo con gen indicador y a las células y el kit para realizar dicho ensayo.

Estado de la técnica

[0003] Las proteínas superficiales de la célula permiten la transducción intracelular de señales extracelulares. Las proteínas superficiales de la célula proporcionan a las células eucariotas así como a las procariotas un medio para detectar señales extracelulares y transducir dichas señales intracelularmente de una manera que en última instancia tiene como resultado una respuesta celular o una respuesta concertada del órgano o del tejido. Las proteínas superficiales de la célula, al transmitir intracelularmente información relativa al entorno extracelular a través de vías intracelulares específicas inducen una respuesta adecuada a un estímulo particular. La respuesta puede ser inmediata o transitoria, lenta o sostenida o una mezcla de ambas. Debido a una serie de proteínas variadas superficiales de la membrana, las células eucariotas son sumamente sensibles a su entorno.

[0004] Las moléculas de señal extracelular, como las citocinas, factores de crecimiento, ciertas hormonas, vasodilatadores y neurotransmisores, ejercen sus efectos, al menos en parte, a través de la interacción con las proteínas superficiales de las células. Por ejemplo, algunas moléculas de señal extracelular provocan cambios en la transcripción del gen objetivo a través de cambios en los niveles de mensajeros secundarios como cAMP. Otras señales alteran indirectamente la expresión del gen activando la expresión de genes, como los genes de expresión rápida que codifican proteínas reguladoras, las cuales a su vez activan la expresión de otros genes que codifican proteínas reguladoras de la transcripción. Otras moléculas de señal extracelular provocan la activación de transductores de señal citoplásmica latente y activadores de la proteína de transcripción (STAT) que mejoran la transcripción de series específicas de genes.

[0005] Los receptores superficiales de las células y los canales de iones son algunas de las proteínas superficiales de la célula que responden a señales extracelulares e inician los eventos que conducen a esta variada expresión y respuesta génica. Los canales de iones y receptores localizados en la superficie de la célula son proteínas de la membrana superficial de la célula ubicuas y fisiológicamente importantes. Desempeñan un papel central en la regulación de los niveles intracelulares de diversos iones y sustancias químicas, muchos de los cuales son importantes para la viabilidad y función celular.

Receptores de la superficie celular

[0006] Los receptores localizados en la superficie celular son proteínas transmembranales que ligan moléculas de señalización extracelular o detectan cambios en el entorno extracelular y transmiten la señal a través de vías de transducción de señales para efectuar una respuesta celular. Los receptores de la superficie celular ligan moléculas de señales circulantes, tales como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, etc., como etapa inicial para la activación de numerosas vías intracelulares. Los receptores se clasifican estructuralmente o en base al tipo particular de vía que es inducida. Entre estas clases de receptores hay clases de receptores de citocinas que incluyen aquellos que enlazan factores de crecimiento y tienen actividad intrínseca de cinasa de tirosina, como los receptores de factores de crecimiento ligado a heparina (HBGF), la superfamilia del receptor de inmunoglobulina, la superfamilia del receptor de hematopoyetina / citocina, la superfamilia del receptor del factor de crecimiento nervioso, otras cinasas de tirosina o serina del receptor, y aquellas que se acoplan a proteínas efectoras a través de proteínas reguladoras ligadas a nucleótidos de guanina, que son denominadas como receptores acoplados a proteínas G y proteínas G, respectivamente.

[0007] Las citocinas son mensajeros intercelulares que coordinan la comunicación entre células dentro de un tejido particular, por ejemplo, interacciones del sistema inmunitario de células T y anticuerpos y sirven para modular o modificar la respuesta biológica. Son pleiotrópicas y tienen un amplio espectro de efectos biológicos sobre más de un tipo de célula o tejido. Los receptores de citocinas se agrupan en general en dos clases; la Clase I de receptores de citocinas incluyen receptores que ligan varias interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15), eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento (GH), el factor que estimula la colonia de granulocitos (G-CSF), el factor que estimula la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor inhibidor de la leucemia (LIF), y factor neurotrófico ciliar (CNTF), TNFalfa TGFbeta, fas ligando, y la Clase II de receptores de citocinas incluyen receptores que ligan interferón (IFN) α/β , IFN γ y IL-10.

Receptores de interferón

[0008] Los interferones humanos (IFNs) son una familia de citocinas helicoidales homólogas compuestas de tres

clases distintas: tipo I, tipo II y tipo III basadas en homología de secuencia de aminoácidos y nucleótidos. Los IFNs de Tipo I humanos consisten en IFN- α , IFN- β y IFN- ϵ . El IFN- α humano incluye un grupo de proteínas estrechamente relacionadas codificadas por al menos 12 genes IFN- α funcionales. IFN- β , IFN- ϵ , IFN-K e IFN- Ω están codificados por genes únicos relacionados de manera más distante. IFN de Tipo II o IFN γ está codificado por un gen no relacionado y ligado a un receptor de superficie celular distinto (De Maeyer et al., 1988; Pestka et al., 1987; Diaz et al., 1993). Recientemente se ha descrito un nuevo grupo de interferones designado IFN- λ o III IFNs de tipo III. El grupo tiene tres miembros IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 también denominados interleucina-29 (IL-29)(λ 1), e IL-28A/B(λ 2/3). (Sheppard et al., 2003; y Ank et al., 2006).

[0009] IFNs de tipo I se ligan a un receptor común, como lo demuestra su capacidad de competir entre sí para fijarse al receptor (Pestka et al., 1987; Branca et al., 1981; y Merlin et al., 1985). El receptor de interferón de Tipo I tiene el mayor número de ligandos naturales, unos 14 en total, de todos los receptores de citocinas conocidos. La fijación de interferones a sus receptores de superficie celular representa la etapa inicial y probablemente más específica de la vía de señalización IFN.

[0010] El receptor IFN Tipo I se compone de dos glicoproteínas transmembrana, IFNAR1 y IFNAR2 (Uze et al., 1990; Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1995; Domanski et al., 1995), que son rápidamente tirosina-fosforiladas después de la fijación IFN (Platanias et al., 1994; Constantinescu et al., 1994; and Abramovich et al., 1994). Ambas subunidades pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas de clase II (Bazan et al., 1990 y Thoreau et al., 1990) y son necesarias para la fijación de ligandos de alta afinidad y el establecimiento de actividad biológica (Langer et al., 1996 y Domanski et al., 1996). Los receptores de citocinas de clase II se distinguen de los receptores de Clase I por el patrón de pares conservados de residuos de cisteína que se supone forman enlaces de disulfuro.

[0011] El receptor de IFN Tipo II (IFN γ) se compone de dos glicoproteínas transmembrana, IFNGR1 y IFNGR2 que están preensambladas en la superficie celular. La fijación de IFN γ a su receptor activa las tirosina quinasas Jak1 y Jak2 con el resultado de tirosina fosforilación y formación de un homodímero Stat1. El homodímero Stat1 activado es translocado al núcleo donde fija la GAS (Secuencia Activada por Gamma) con el resultado de la activación transcripcional de genes activados por IFN γ .

[0012] los interferones de Tipo III se fijan a un receptor único que comprende el IL-28R α , que es específico para la cadena IFN- λ s y la cadena IL-10R β que es también parte de los receptores para IL-10, IL-22 e IL-26 (Ank et al., 2006).

[0013] En comparación con otros receptores de citocinas, particularmente el receptor IFN- γ , ni IFNAR1 ni IFNAR2 solos se fijan a IFN α o IFN β con una afinidad comparable al heterodímero. A pesar de que IFNAR2 desempeña un papel prominente en la fijación de ligandos, IFNAR1 contribuye a la fijación de IFN aumentando la afinidad del complejo receptor (4-10 veces) con respecto a la de IFNAR2 solo. IFNAR1 también modula la especificidad de la fijación de ligandos con respecto a la observada en IFNAR2 solo (Cohen et al., 1995; Russell-Harde et al., 1995; Cutrone et al., 1997; and Cook et al., 1996). IFNAR1 tiene un dominio extracelular más grande que otros receptores de citocinas de clase II, compuesto de 4 subdominios de tipo inmunoglobulina separados por motivos di- o tri-prolina que pueden dividirse en dos repeticiones en tándem ((Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1992; y Uzé et al., 1995).

[0014] El IFNAR1 humano, murino y bovino ha sido clonado y expresado en células murinas y humanas. Estudios realizados con células transfectadas muestran que IFNAR1 desempeña un papel central en la fijación de ligandos, respuestas celulares a IFNs y en la inducción de las actividades biológicas de los interferones de Tipo I (Novick et al., 1994; Abramovich et al., 1994; Uzé et al., 1992; Mouchel-Vielh et al., 1992; Lim et al., 1993; Cleary et al., 1994; Constantinescu et al., 1995; Hwang et al., 1995; Vandebroek et al., 1995; and Colamonici et al., 1994). El receptor IFN también determina el alto grado de las características de especificidad de especie de los IFNs. Por lo tanto, la transfección de células de ratón con IFNAR1 y IFNAR2 hace a las células de ratón sensibles a IFNs de tipo I humanos y las células de ratón comparten una vía de señalización común y elementos de respuesta a IFN comunes en las regiones promotoras de genes regulados por IFN. Además, se ha demostrado que el dominio intracelular de IFNAR1 desempeña un papel clave en la transducción de la señal iniciada en la superficie de la célula al núcleo después de la fijación de interferones Tipo I (Basu et al. 1998). La destrucción dirigida del gen IFNAR1 tiene como resultado la pérdida de la respuesta antiviral a IFNs de tipo I demostrando que este polipéptido receptor es un componente esencial del complejo receptor y que ambas subunidades IFNAR1 e IFNAR2 son necesarias para la señalización de IFN α e IFN β (Vandebroek et al., 1995; Muller et al., 1994; Fiette et al., 1995; Steinhoff et al., 1995; y van den Broek et al., 1995).

[0015] La fijación del interferón de tipo I al complejo receptor activa dos quinasas Janus, Tyk2 y JAK1, que intervienen en la tirosina fosforilación y activación de dos factores de transcripción citoplásmica latentes STAT1 y STAT2 que forman un complejo (ISGF3) con una proteína de fijación de ADN p48, proteína de respuesta a interferones 9 (IRF 9), que es translocada al núcleo para promover la transcripción génica específica (Fu et al., 1992; Schindler et al., 1992; Darnell et al., 1994; Ihie et al., 1995; y Taniguchi, 1995). Tanto Tyk2 como STAT2 están asociadas por constitución con la zona proximal de membrana de la cadena IFNAR1, mientras que JAK1 y STAT1 están físicamente asociadas con IFNAR2 y los cuatro factores son rápidamente activados durante la estimulación de IFN α (Lutfalla et al., 1995; Bazan, 1990; Basu et al., 1998; Barbieri et al., 1994; Velázquez et al., 1995; Uddin et al.,

1995; Yan et al., 1996(a) y 1996(b).

[0016] La fijación de IFNs de tipo III a sus receptores de superficie celular también activa el complejo ISGF3 sugiriendo que los IFNs de tipo III también activan un número de genes al igual que los IFNs de tipo I (Ank et al. 2006).

Receptores de reconocimiento de patrones

[0017] Poblaciones clave de células incluyendo células dendríticas (DCs) distribuidas por todos los tejidos periféricos actúan como centinelas capaces de reconocer agentes infecciosos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos incluyen la familia de receptores tipo Toll (TLR) de receptores de membrana endosomal y de superficie celular (Uematsu y Akira, 2007) y las proteínas receptoras citosólicas de tipo gen I (RIG-I) inducibles por ácido retinoico RIG-I, MDA5, y LGP2 (Yoneyama y Fujita, 2007). Trece miembros de la familia TLR han sido identificados en mamíferos (Uematsu y Akira, 2007). Cada TLR media en una respuesta característica en asociación con diferentes combinaciones de cuatro proteínas adaptadoras que contienen dominio (TIR) de receptores Toll/IL-1 (MyD88, TRIF, TIRAP/MAL, y TRAM). Todos los TLRs excepto TLR3 interactúan con MyD88. TLR3, que reconoce ARN viral monocatenario o bicatenario, está localizado en los endosomas de DCs mieloides y requiere la acidificación de vesículas para su activación. TLR3 señala vía TRIF y activa TBK1/IKKe que fosforila el factor regulador de interferones 3 (IRF3) y NFkB, con el resultado de producción de IFN β (Hemmi et al, 2004, Perry et al., 2004). Las proteínas receptoras de tipo RIG-I son helicasas de ARN DExD box dos de las cuales, RIG-I y MDA5, comportan motivos de tipo de dominio de reclutamiento y activación de caspasa (CARD) en el término-N (Yoneyama y Fujita, 2007). El dominio CARD interactúa con IPS-1 con el resultado de activación de IRF3 y NFkB y la producción de IFN β . Por lo tanto, la activación de PRRs conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias incluyendo IFNs de tipo I y la activación de la respuesta inmune innata.

[0018] Las células dendríticas señalan principalmente a través de TLRs mientras que los receptores de tipo RIG-I predominan en otros tipos de células. En el ser humano se puede distinguir dos sub-conjuntos principales de DC, DCs mieloides derivadas de monocitos CD11c(+), presentes en la mayoría de tejidos y DCs (pDCs) plasmacitoides CD11c(-) presentes principalmente en nodos de linfa. Las DCs plasmacitoides son las principales productoras de IFNs de tipo I como respuesta a los virus (Steinmann y Hemmi, 2006). Las DCs plasmacitoides expresan altos niveles de TLR7/8 y TLR9 que reconocen ARN monocatenario (ssRNA) y ADN CpG respectivamente (Diebold et al. 2004, Heli et al., 2004). Hemmi et al., 2000). La activación de TLR7/8 y TLR9 conduce a la formación de un complejo con MyD88 y fosforilación de IRF7 y la producción de altos niveles de IFNs de tipo I (Uematsu y Akira, 2007).

Receptores TNF

[0019] El factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) es una citocina multifuncional que ejerce efectos pleiotrópicos sobre diferentes tipos de células. TNF- α se sintetiza como pro-TNF, una proteína ligada a membrana 26 kDa, que se libera por la escisión de su pro dominio por la enzima convertidora de TNF (TACE) para producir una proteína 17 kDa que consiste en 157 aminoácidos que existen como un homotrímero en solución. TNF- α se fija a dos receptores distintos TNFR-1 (p55) y TNFR2 (p75). TNFR1 contiene un dominio de muerte (ausente de TNFR2) que está implicado en la inducción de apoptosis. La fijación del homotrímero TNF- α a TNFR-1 tiene como resultado la trimerización de TNFR-1 y la liberación del silenciador del dominio de muerte (SODD). El dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD) se fija al dominio de muerte de TNFR-1 y recluta a las proteínas adaptadoras, la proteína que interactúa con receptores (RIP), el factor 2 asociado a TNFR (TRAF-2) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). TNFR-1 señala la apoptosis, por fijación de la procaspasa-8 a FADD cuya activación conduce a la inducción de una cascada de proteasas que promueve la apoptosis. TNFR-1 señala la supervivencia por reclutamiento de TRAF-2 que inhibe la apoptosis a través del inhibidor citoplasmático de proteínas de apoptosis (cIAP). Una de las principales vías de señalización promovida por el reclutamiento de TRAF-2 y RIP al complejo receptor TNFR-1 es la vía NF-KB que transduce una señal al núcleo que culmina en la activación transcripcional de un número de genes objetivo TNF (Schwamborn et al., 2003). NF-KB es un factor de transcripción ubicuo inducido por un número de citocinas (incluyendo IFN γ , IL2, IL5 y IFN α (2). NF-KB participa en la regulación de numerosos genes implicados en procesos, incluyendo, la respuesta inflamatoria, apoptosis, cáncer, supervivencia neuronal e inmunidad innata. La activación de NF-KB se controla principalmente a nivel post-transcripcional por degradación de la subunidad IKB inhibitoria del complejo p55/p65/IKB presente en el citoplasma. Activar estímulos tales como TNF α activan un complejo de quinasas compuesto de dos quinasas específicas IxB (IKK α e IKK β) y una subunidad moduladora (NEMO o IKK γ). Ello produce la fosforilación de la subunidad inhibitoria, la cual es a continuación ubiquitinilada y degradada a través de la proteasoma. Esto promueve la translocación de NF-KB en el núcleo, donde inicia la transcripción fijándose a secuencias reguladoras (reconocimiento NF-KB/secuencias de fijación) presentes en la región promotora de genes objetivo NF-KB.

Receptores acoplados a G

[0020] Las vías de señalización transmembrana de la proteína G consisten en tres proteínas: receptoras, proteínas G y efectoras. Las proteínas G, que son las intermediarias en las vías de señalización transmembrana, son heterodímeros y consisten en subunidades alfa, beta y gama. Entre los miembros de una familia de proteínas G las

subunidades alfa difieren. Las funciones de las proteínas G están reguladas por la asociación cíclica de GTP con una subunidad seguida por hidrólisis de GTP a GDP y disociación de GDP.

[0021] Los receptores acoplados a proteína G son una clase distinta de receptores que median en la transducción de señales fijándose a proteínas G. La transducción de señales se inicia a través de la fijación de ligandos al receptor de membrana celular, que estimula la fijación del receptor a la proteína G. La interacción proteína G - receptor libera GDP, que está específicamente fijado a la proteína G, y permite la fijación de GTP, que activa la proteína G. La proteína G activada se disocia del receptor y activa la proteína efectora, que regula los niveles intracelulares de mensajeros secundarios específicos. Ejemplos de tales proteínas efectoras incluyen adenil ciclasa, guanil ciclasa, fosfolipasa C y otras.

Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento

[0022] Los factores de crecimiento polipeptídicos son moduladores de la proliferación y diferenciación celular cuyas funciones biológicas son mediadas por la interacción del factor de crecimiento con receptores de superficie celular y alteraciones subsiguientes en la expresión génica. Los factores de crecimiento se fijan a receptores específicos y parecen inducir la fosforilación de tirosina y la síntesis mRNA c-fos. Además, al menos algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Yeh et al., 1987) y el factor de crecimiento-2 de fijación de heparina o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Bouche et al., 1987) son translocados al núcleo.

[0023] La activación de receptores de factores de crecimiento por interacción con factores de crecimiento específicos o con agentes como acetato métrico de forbol (PMA) activa la proteína quinasa C, que es una familia de proteínas quinasas activadas por calcio y fosfolípidos. Esta activación tiene como resultado la transcripción de una serie de genes que codifican factores de transcripción de proto-oncogenes, incluyendo c-fos, c-myc y c-jun, proteasas, inhibidores de proteasas, incluyendo el inhibidor activador de plasminógeno y colagenasa tipo I, incluyendo la molécula I de adhesión intercelular. La activación de proteína quinasa C antagoniza la actividad del factor de crecimiento por la rápida fosforilación de receptores del factor de crecimiento, lo cual reduce la actividad de la tirosina quinasa. Se cree que los factores de crecimiento y otros mitógenos que inducen la proliferación celular y el crecimiento celular desempeñan un papel en el crecimiento tumoral, que a menudo conllevan receptores de superficie celular específicos de los factores de crecimiento y otras señales extracelulares.

[0024] La interacción del factor de crecimiento nervioso (NGF) con su receptor es típica de la serie de respuestas como las que induce la señal extracelular. NGF es una hormona de crecimiento polipéptido que es necesaria para la diferenciación y crecimiento de la neurona sensorial derivada de la cresta neural. NGF se fija a su receptor de superficie celular específico y es transportada retrógradamente al cuerpo celular (Changelian et al., 1989). Ello inicia una cascada de eventos intracelulares, que culminan en un fenotipo diferenciado. Las células PC12, que son una línea celular del feocromocitoma de rata, se utilizan como modelo para el estudio de la diferenciación mediada por NGF. Cuando se tratan con NGF, las células PC12 cambian de células replicantes de tipo cromafines-adrenales a células no replicantes, de tipo neuronas simpáticas eléctricamente excitables.

[0025] Simultáneamente a los cambios fenotípicos, se produce inducción y expresión de genes específicos. La fijación de NGF a células PC12 induce la expresión rápida e inmediata de ciertos genes, incluyendo los genes c-fos, NGF1-A y NGF1-B, que son denominados genes tempranos. Se cree que dichos genes tempranos codifican reguladores transcripcionales. El producto génico NGF-1A contiene dominios "dedo de cinc" repetidos en parejas que son característicos de proteínas que fijan ADN y la proteína NGF1-B es similar a los miembros de la familia de receptores glucocorticoides y por lo tanto, puede funcionar como un modulador de transcripción dependiente de ligandos. El producto génico c-fos, FOS, parece funcionar como molécula reguladora transcripcional.

Los genes c-fos y genes relacionados

[0026] Como se ha mencionado más arriba, la inducción de expresión del gen c-fos es un evento común a un número de vías de respuesta que se inician por la actividad de una variedad de proteínas de superficie celular.

[0027] El producto génico c-fos, FOS, se asocia con el activador de transcripción JUN, que es el producto del gen c-jun, para formar un complejo que forma un complejo de activación de transcripción, AP-1. La transcripción de c-fos y c-jun es inducida rápida y transitoriamente después de la estimulación. Los mRNA inducidos se acumulan durante 1-2 horas en el citoplasma donde son trasladadas las proteínas FOS y JUN, de corta vida, y luego translocadas al núcleo para formar un complejo de proteínas heterodimérico que se fija al elemento regulador de ADN, el sitio de fijación AP-1.

[0028] Los genes c-fos y c-jun son miembros de familias génicas que codifican proteínas que participan en la formación de complejos heterodiméricos que interactúan con sitios de fijación a AP-1. El factor de transcripción AP-1 se compone de varios complejos proteínicos cuyas concentraciones cambian por estimulación celular. Estos complejos interactúan específicamente con motivo de secuencia de nucleótidos de núcleo de siete bases conocido por ser un componente relativamente común de elementos reguladores transcripcionales positivos y negativos y que

es necesario tanto para niveles basales e inducidos de expresión génica.

[0029] Los productos génicos, FOS y JUN cooperan en la regulación de genes objetivo que sustentan muchas respuestas celulares y adaptativas al entorno. Participan en una serie de procesos neurofisiológicos.

[0030] Por lo tanto, la inducción de c-fos implica vías de mensajeros secundarios que actúan a través de elementos reguladores independientes y que modifican diferencialmente el producto génico resultante, FOS, el cual a su vez interactúa de formas diferentes con la proteína JUN diferencialmente modificada. Por lo tanto, una multitud de eventos extracelulares induce la expresión de un pequeño número de proteínas inducibles que forman una serie de complejos de proteínas que se pueden fijar diferencialmente a elementos reguladores de ADN que contienen sitios de fijación a AP-1. Por lo tanto, numerosas proteínas de superficie celular pueden actuar a través de vías de transducción superpuestas y transducir señales extracelulares que en última instancia inducen una variedad de respuestas.

[0031] Hay muchos ensayos que pueden depender de la actividad in vivo en una línea celular viva. Un ejemplo es una línea celular que tiene un Elemento de Respuesta a la Estimulación con IFN (ISRE) conectada a un gen de luciferasa u otro gen indicador, de manera que cuando la línea celular está sujeta a la presencia de interferón como una señal extracelular, la actividad de transducción de señal de receptores de superficie celular del interferón endógeno produce una señal que activa el ISRE, el cual provoca a continuación la transcripción del gen de luciferasa. Por lo tanto, la actividad de luciferasa en la creación de luz puede medirse y está relacionada con la cantidad de interferón que está presente en la muestra, y que es proporcional a la cantidad de interferón en una línea particular (Lallemand et al., 1996).

[0032] Leonart et al. (1990) describieron un ensayo de gen indicador para interferón Tipo I basado en células Vero de mono transfectadas con promotor Mx de ratón inducible por interferón tipo I vinculado al gen (hGH) de la hormona de crecimiento humana como gen indicador. Este ensayo de interferón tipo I fue desarrollado posteriormente transfectando células Vero de mono con un plásmido que comportaba el gen indicador luciferasa bajo el control del promotor Mx1 de ratón inducible por interferón tipo I (Canosi et al., 1996).

[0033] Otro tipo de ensayo de gen indicador de interferón fue desarrollado por Hammerling et al. (1998) que utilizaron una línea celular glioblastoma humana transfectada con un constructo génico indicador de promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y un gen indicador de la β -galactosidasa E. coli (lacZ). En este ensayo particular, lo que se mide es la reducción/inhibición de la expresión β -galactosidasa por interferón humano tipo I o tipo II de una manera selectiva y dependiente de la dosis.

[0034] Las proteínas terapéuticas y en particular los biofarmacéuticos recombinantes representan una clase importante y creciente de agentes terapéuticos. La seguridad y eficacia de las proteínas terapéuticas puede verse gravemente afectada, por su inmunogenicidad. Además de afectar a la farmacocinética, farmacodinámica, biodisponibilidad y eficacia, los anticuerpos anti-medicamentos pueden producir también enfermedades del complejo inmunitario, reacciones alérgicas y en algunos casos reacciones autoinmunes graves (Casadevall et al., 2002 y Neumann et al. 2000). Está ampliamente aceptado que la inyección de proteínas extrañas en humanos puede provocar una reacción inmune que conduce a la producción de anticuerpos de fijación y en algunos casos neutralizantes (NABs). Los anticuerpos neutralizantes bloquean la actividad biológica de un biofarmacéutico ya sea fijándose directamente a un epítipo dentro o cerca del sitio activo de la proteína o a un epítipo que impide la fijación del medicamento a un receptor de superficie celular. Cada vez resulta más claro, sin embargo, que la inyección repetida de homólogos recombinantes de proteínas humanas auténticas, como interferón beta (IFN β) o eritropoyetina especialmente agregados o parcialmente desnaturalizados, puede tener como resultado una ruptura de la tolerancia a los auto-antígenos que promueven la producción de NABs (Schellekens, 2008). Esto es de particular importancia en el tratamiento de enfermedades crónicas como ciertas forma de cáncer y enfermedad autoinmune. Ello puede tener como resultado que el paciente no responda a la terapia y puede incluso ser peligroso en el caso de NABs que tienen una reacción cruzada con una proteína endógena no redundante esencial como eritropoyetina (Casadevall et al., 2002), o factor de desarrollo y crecimiento de megacariocitos, MGDF (Neumann et al., 2000). La evaluación de la inmunogenicidad es por lo tanto un componente importante de la evaluación de la seguridad medicamentosa en estudios clínicos y pre-clínicos y un prerrequisito para el desarrollo de biofarmacéuticos más seguros y menos inmunogénicos. Monitorizar a los pacientes para detectar la presencia de NABs en biofarmacéuticos y la correlación de inmunogenicidad con datos clínicos es clave para determinar la seguridad de tratamiento y para la interpretación de datos clínicos.

[0035] Los resultados de una serie de grandes estudios clínicos aleatorizados han demostrado que interferón beta (IFN β) reduce la frecuencia y gravedad de recaídas clínicas, ralentiza la progresión de la enfermedad y mejora la calidad de vida en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente (RRMS) (Clerico et al., 2007; y McCormick et al., 2004). El tratamiento repetido con IFN β recombinante, sin embargo, puede producir una ruptura en la tolerancia inmune a auto-antígenos en algunos pacientes, con el resultado de la producción de anticuerpos neutralizantes (NAB) del homólogo de proteínas recombinantes (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). La aparición de NABs está asociada con una farmacodinámica reducida (inducción de productos génicos que responden a IFN β); Deisenhammer et al., 2004) y una respuesta clínica reducida determinada por

representación óptica por resonancia magnética (MRI) o progresión de la enfermedad (Hartung et al., 2007; Noronha, 2007; y Namaka et al., 2006). La frecuencia y títulos de anticuerpos anti-IFN β varían como función del tipo de preparación IFN β utilizada para tratar al paciente, así como la frecuencia y vía de administración. Aunque las comparaciones directas entre muchos de los estudios son difíciles debido al uso de diferentes estándares y ensayos de neutralización, los estudios comparativos han demostrado que IFN β -1b es más inmunogénico que IFN β -1a (Bertolotto et al., 2002) debido posiblemente a la menor actividad específica de IFN β -1b y de ahí la masa proteínica más alta inyectada (Antonetti et al., 2002). Diferencias de aminoácidos, falta de glicosilación de IFN β -1b recombinante en comparación con la proteína nativa o formas actualmente autorizadas de IFN β -1a, o características de formulación también pueden contribuir a la inmugenicidad de IFN β -1b (Giovannoni, 2004).

[0036] Para cuantificar NAb anti-medicamentos se utilizan dos enfoques principales: el método antígeno constante en el que una cantidad constante de medicamento (por ej. IFN) se mezcla con diluciones seriadas de suero, y el método de anticuerpos constantes en el que una dilución de suero fija se mezcla con una concentración variable de medicamento. En ambos casos el punto final de valoración se toma por lo general como la mediana de los valores máximo y mínimo de la curva de respuesta a la dosis que se define como una unidad de laboratorio (LU). El título NAb se determina por lo general utilizando el método de cálculo Kawade que determina la dilución de suero que reduce la actividad del medicamento de 10 a 1 LU/ml (Grossberg et al., 2001a y 2001b). La actividad medicamentosa residual se determina por lo general utilizando un ensayo basado en células. Dichos ensayos son notoriamente difíciles de estandarizar y son en el mejor de los casos semi-cuantitativos debido a la ausencia de estándares adecuados para NAb anti-medicamentos.

[0037] Los métodos actuales para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes para IFN α o IFN β se basan en la inhibición de la actividad IFN determinada utilizando o bien bioensayos antivirales (Grossberg et al., 2001a y 2001b) o bien la inducción de una proteína inducida por IFN (Deisenhammer et al., 2004). Los bioensayos basados en la capacidad de IFNs de inhibir la replicación de virus 1) son imprecisos y requieren operadores diestros para obtener resultados reproducibles, 2) únicamente se pueden detectar diferencias dobles o mayores, 3) dan resultados variables y 4) se tarda varios días en completarlos. La medición de la inducción de una proteína antiviral inducida por IFN como MxA requiere el uso de líneas de células o sangre periférica, y la subsiguiente evaluación de niveles de proteínas por ELISA o mediación de niveles MxA mRNA (Deisenhammer et al., 2004).

[0038] Recientemente se ha desarrollado un método altamente sensible y reproducible para cuantificar la actividad IFN tipo I, basado en células U937 pro-monocíticas humanas, transfectadas con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga controlado por un promotor quimérico de respuesta (Lallemant et al., 2008) que permite determinar la actividad IFN selectivamente con un alto grado de precisión y en pocas horas. El tratamiento de estas células (PIL5) con la vinblastina de medicamentos anti-mitóticos permite almacenar células congeladas durante periodos prolongados sin pérdida de sensibilidad IFN o la necesidad de cultivar células y evita la variación de ensayos asociada a la proliferación celular (Lallemant et al., 2008). Aunque este ensayo supera muchas de las limitaciones de los ensayos convencionales de neutralización basados en células u otros ensayos con genes indicadores (Lam et al., 2008) para la determinación de actividad IFN o para la cuantificación de NAb anti-IFN, sigue siendo relativamente trabajoso. Por lo tanto, la cuantificación de NAb anti-IFN requiere diluciones seriadas de la muestra de suero a someter a prueba, una curva de respuesta a la dosis de IFN simultánea, y controles positivos y negativos a incluir en cada ensayo así como la disponibilidad de reactivos de referencia.

[0039] Los bioensayos para TNF- α se basan en la capacidad de TNF- α de inducir apoptosis en células susceptibles como las células L929 de ratón, generalmente en presencia de actinomicina D. Dichos ensayos son imprecisos y difíciles de usar para determinar NAb para antagonistas TNF- α como Infliximab, Adalimumab o etanercept (Meager A, 2006. W02004/039990A2 revela (§ 59-1 15, reivindicaciones 1-28): Una célula para utilizar en la determinación de la presencia y/o nivel de ligando extracelular (por ej. interferón), comprendiendo dicha célula un primer constructo de ADN que tiene una secuencia que comprende elementos de control de transcripción inducibles (por ej. ISRE) operativamente unida a una porción que codifica una primera etiqueta mensurable (proteína indicadora como luciferasa o GFP). Tovey (Journal of Interferon and Cytokine Research, vol. 27, n° 8, pág. 735) y Farrell (Neurology, Vol. 68, n° 12, Suppl. 1, páginas A117-A118) revelan una célula para ser utilizada en ensayos con anticuerpos para un ligando extracelular (interferón) que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de la célula, comprendiendo dicha célula un primer constructo de ADN que comprende un gen indicador de luciferasa controlado por promotor quimérico de respuesta a IFN, que permite determinar la actividad IFN.

[0040] La cita de cualquier documento no pretende admitir que dicho documento sea el estado de la técnica pertinente, o considerado importante para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración sobre el contenido o una fecha de cualquier documento están basadas en la información disponible al solicitante en el momento de la presentación y no constituye una aceptación de que dicha declaración sea correcta.

Descripción breve de la invención

[0041] La invención es tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona una célula para usar en ensayos de anticuerpos contra un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el

núcleo de la célula. La célula según la presente invención contiene (1) un primer constructo de ADN que tiene una secuencia que incluye una primera serie de uno o más elementos de control de transcripción, que es inducible por el ligando, y también codifica una primera etiqueta mensurable (primer producto génico indicador), cuya expresión es promovida por la primera serie de uno o más elementos de control de transcripción cuando es inducida por la presencia del ligando y (2) un segundo constructo de ADN que tiene una secuencia que incluye una segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción diferente de la primera, un segmento de ADN que codifica una segunda etiqueta mensurable (segundo producto génico indicador) cuya expresión es promovida por la segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción, y en un cistron separado un segmento que codifica un ligando, cuya expresión es también promovida por la segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción.

[0042] La presente invención también proporciona un kit que contiene una pluralidad de células según la presente invención, siendo utilizado dicho kit para determinar en una muestra el nivel de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de la célula o de un anticuerpo neutralizante contra el ligando extracelular o un antagonista del ligando extracelular. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para determinar dicho nivel en una muestra.

Descripción breve de las figuras

[0043] La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de las fases realizadas en el reciente ensayo basado en células "iLite" y en el ensayo de una fase "NanoLite" según la presente invención.

[0044] La Figura 2 es una ilustración esquemática de un modo de realización en el que el ligando (citocina) y el gen indicador de luciferasa Renilla (RL) son expresados por el mismo promotor. La luciferasa Renilla permanece en la célula mientras que la citocina expresada es secretada, interactuando con un receptor para el ligando de citocina que inicia la transducción de señal para promover la expresión de luciferasa de luciérnaga (FL) a partir de un promotor de respuesta-ligando citocina. La presencia de anticuerpos neutralizantes (NAb) para la citocina impide que la citocina interactúe con su receptor de superficie celular y el resultado es una reducción de la actividad de la citocina (determinada por la actividad relativa del indicador de luciferasa de luciérnaga de respuesta a citocina, FL1/RL (control) > FL2/RL).

[0045] La Figura 3 es una vista esquemática de dos constructos separados, un promotor mínimo ISRE/SV40 que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga y un promotor citomegalovirus (CMV) que promueve la expresión del interferón $\alpha 2a$ (IFN $\alpha 2a$) y el gen indicador de luciferasa de Renilla.

[0046] La Figura 4 es una vista esquemática de dos constructos separados, un promotor mínimo ISRE/SV40 que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga y el promotor de expresión rápida mínima de citomegalovirus (CMV) que promueve la expresión del interferón $\alpha 2a$ (IFN $\alpha 2a$) y el gen indicador de luciferasa de Renilla pero con el orden de expresión de IFN $\alpha 2a$ y luciferasa de renilla invertidos con respecto al que aparece en la Fig. 3.

[0047] La Figura 5 es una vista esquemática de dos constructos separados, un promotor mínimo ISRE/SV40 que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga y un elemento de respuesta a tetraciclina (Tet)/el promotor de expresión rápida CMV que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de Renilla y IFN $\alpha 2a$ (Tet-On). A falta de tetraciclina o doxiciclina, el represor de Tet inverso (rTetR) se fija al TRE, silenciando la transcripción. También se ilustra la fijación del transactivador de tetraciclina inverso (rtTA) al TRE después de la adición de tetraciclina o doxiciclina que conduce a la activación de la transcripción.

[0048] La Figura 6 es una vista esquemática de dos constructos separados, un promotor mínimo ISRE/SV40 que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga y un elemento de respuesta a tetraciclina (Tet)/promotor de expresión rápida CMV que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de Renilla y IFN β (Tet-On).

[0049] La Figura 7 es una vista esquemática de dos constructos independientes para un ensayo de gen indicador para NAb anti-TNF α , 5 repeticiones en tándem del promotor mínimo SV40/sitio de reconocimiento NFkB canónico que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga, y un promotor mínimo de expresión rápida CMV/elemento de respuesta Tet (TRE) que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de renilla y TNF α (Tet-On).

[0050] La Figura 8 es una vista esquemática de tres constructos independientes para un ensayo de gen indicador para Nabs antagonistas de anti-TNF α : 5 repeticiones en tándem del promotor mínimo SV40/sitio de reconocimiento NFkB canónico que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de renilla; un promotor mínimo de expresión rápida CMV/elemento de respuesta Tet (TRE) que promueve la expresión del gen indicador CBRLuc y TNF α (Tet-On); y un promotor inducible de mifepristona quimérico que promueve la transcripción del gen indicador CBG68Luc y el antagonista de TNF α . El promotor quimérico inducible de mifepristona consiste en la secuencia TATA y GAL4-UAS del promotor mínimo E1b Adenovirus que es transcripcionalmente silencioso a falta de

activación. El dominio de fijación al ADN Gal4 que une la proteína reguladora al promotor GAL4-Elb y el dominio de fijación al ligando receptor de progesterona humana truncado (hPR-LBD) que experimenta un cambio de conformación cuando fija la mifepristona antagonista de progesterona se expresan a partir de un promotor TK mínimo en el vector. Por lo tanto, al añadir mifepristona, el antagonista se fija a la región hPR-LBD del vector provocando un cambio de conformación en la proteína reguladora con el resultado de la transcripción del antagonista TNF α y el gen indicador CBG68Luc.

[0051] La Figura 9 es una vista esquemática de dos constructos independientes para un ensayo de gen indicador para Nab anti-eritropoietina (EPO), 5 repeticiones en tándem del transductor de señal y activador de transcripción #5 (STAT5)/promotor mínimo SV40 que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga y un elemento de respuesta Tet (TRE)/promotor mínimo de expresión rápida CMV que promueve la expresión del gen indicador de luciferasa de renilla y EPO (Tet-On).

[0052] La Figura 10 muestra una representación esquemática de un constructo de gen indicador de luciferasa donde la expresión de luciferasa está bajo el control de un promotor quimérico que contiene un elemento de respuesta a la estimulación con IFN (ISRE) del gen ISG15 y un promotor SV40 mínimo.

[0053] La Figura 11 muestra una vista esquemática de un constructo de gen indicador de proteína fluorescente verde mejorada (EGFP-1) en el que la expresión de EGFP-1 está bajo el control de un promotor quimérico que contiene un ISRE del gen ISG15 y un promotor SV40 mínimo.

[0054] La Figura 12 es un gráfico que muestra la curva de valoración de anticuerpos neutralizantes anti-IFN α utilizando el método de la presente invención.

[0055] La Figura 13 es un gráfico de las unidades de luminiscencia relativa (RLU) observadas durante el ensayo de anticuerpos neutralizantes para IFN α según el método de la presente invención en células no transfectadas o transfectadas con pIRES IFNA2 RL como segunda molécula de ADN.

[0056] La Figura 14 es una vista esquemática de dos constructos separados para el ensayo de una fase en el ejemplo que sigue. Las abreviaturas son las siguientes: ISRE: Elemento de respuesta a la estimulación con IFN; SV40 Min. Prom: Promotor mínimo SV40; Intrón: Intrón del gen β -globulina humano; SV40 Poly A: Sitio de poliadenilación SV40; Luciferasa de luciérnaga: Región codificadora del gen de luciferasa de luciérnaga; TRE: elemento de respuesta a tetraciclina; rTetR: Represor de tetraciclina inverso; Tetra: Tetraciclina; CMV Mini: Promotor mínimo CMV; IFN α 2a: Región codificadora y péptido de señal del gen de interferón humano; IRES: Internal ribosomal entry site (sitio interno de entrada al ribosoma); y Luciferasa de renilla: Región codificadora del gen de luciferasa de renilla

[0057] Las Figuras 15A y 15B son gráficos que muestran el efecto de la concentración de doxiciclina en la expresión de la actividad de luciferasa de renilla y luciérnaga en el ensayo de una fase. Las células del ensayo de una fase (PIL5C2.2) fueron tratadas con concentraciones variables de doxiciclina tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos e incubadas durante la noche por duplicado con doxiciclina solo o con una dilución 1/1.000 de un anticuerpo de IFN α anti-humano policlonal tal como se indica en la figura. Las actividades de la luciferasa de renilla y de luciérnaga determinadas secuencialmente en el mismo pocillo utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron lisadas a continuación añadiendo 75 μ l/pocillo del sustrato de luciferasa de luciérnaga conteniendo reactivo, y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de luciferasa de renilla fue determinada a continuación después de añadir en el mismo pocillo 50 μ l de sustrato de luciferasa de renilla. La actividad neutralizante de la muestra NAb fue determinada a continuación a partir del ratio de la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra conteniendo NAb (FL2) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla (RL2) y la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra de control (FL1) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla de la muestra de control (RL1): (FL2/RL2)/(FL1/RL1). En las Figs. 15A y 15B, RL representa la luciferasa de renilla y luc representa la luciferasa de luciérnaga.

[0058] Las Figuras 16A y 16B son gráficos que muestran el efecto de la concentración de doxiciclina en la expresión de la actividad de luciferasa de renilla y luciérnaga en el ensayo de una fase. Las células del ensayo de una fase (PIL5C2.2) fueron tratadas con concentraciones variables de doxiciclina tal como se indica en la figura e incubadas durante la noche por duplicado con doxiciclina solo o con una dilución 1/10 o dilución 1/100 de suero humano indicado en la figura. Las actividades de la luciferasa de renilla y de luciérnaga determinadas secuencialmente en el mismo pocillo utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron lisadas a continuación añadiendo 75 μ l/pocillo del sustrato de luciferasa de luciérnaga conteniendo reactivo, y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de luciferasa de renilla fue determinada a continuación después de añadir en el mismo pocillo 50 μ l de sustrato de luciferasa de renilla. La actividad neutralizante de la muestra NAb fue determinada a continuación a partir del ratio de la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra conteniendo NAb (FL2) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla (RL2) y la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra de control (FL1) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla de la muestra de control (RL1): (FL2/RL2)/(FL1/RL1).

[0059] La Figura 17 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de doxíciclina en la expresión de la actividad de luciferasa de renilla y de luciérnaga en el ensayo de una fase. Las células del ensayo de una fase (PIL5C2.2) fueron tratadas con concentraciones variables de doxíciclina tal como se describe en Materiales y Métodos e incubadas durante la noche por duplicado. Las actividades de la luciferasa de renilla y de luciérnaga determinadas secuencialmente en el mismo pocillo utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron lisadas a continuación añadiendo 75 μ l/pocillo del sustrato de luciferasa de luciérnaga conteniendo reactivo, y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de luciferasa de renilla fue determinada a continuación después de añadir en el mismo pocillo 50 μ l de sustrato de luciferasa de renilla.

[0060] La Figura 18 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración variable de doxíciclina en las actividades de neutralización del suero humano en el ensayo de una fase. Las células del ensayo de una fase (PIL5C2.2) fueron tratadas con concentraciones variables de doxíciclina tal como se indica en la figura e incubadas durante la noche por duplicado con doxíciclina solo o con una dilución 1/20 de suero humano indicado en la figura. Las actividades de la luciferasa de renilla y de luciérnaga determinadas secuencialmente en el mismo pocillo utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron lisadas a continuación añadiendo 75 μ l/pocillo del sustrato de luciferasa de luciérnaga conteniendo reactivo, y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de luciferasa de renilla fue determinada a continuación después de añadir en el mismo pocillo 50 μ l de sustrato de luciferasa de renilla. La actividad neutralizante de la muestra NAb fue determinada a continuación a partir del ratio de la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra conteniendo NAb (FL2) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla (RL2) y la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra de control (FL1) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla de la muestra de control (RL1): (FL2/RL2)/(FL1/RL1).

[0061] Las Figuras 19A y 19B son gráficos que muestran la cuantificación de NAb utilizando una concentración de IFN constante (100 IU/ml) contra concentraciones de suero variables (Fig. 19A) o concentración de IFN variable contra concentración de suero constante (1/100) (Fig. 19B). Diluciones seriadas de suero humano fueron incubadas por duplicado durante 1 hora a 37°C seguidas de 2 horas a 4°C con una cantidad constante (10 LU/ml) de un IFN α 2 tal como se describe en Materiales y Métodos (Figura 19A), o una dilución constante de suero (1:100) fue incubada en las mismas condiciones con diluciones seriadas de IFN (Figura 19B). Luego se determinó la actividad IFN residual utilizando el ensayo de gen indicador PIL5 tal como se describe en Materiales y Métodos. La preparación de IFN utilizada en cada test de neutralización fue también valorada simultáneamente para determinar su actividad IFN precisa en el ensayo de ese día. La dilución más baja del suero sometido a prueba fue también valorada sola para determinar la presencia de toxicidad o actividad IFN. El título neutralizante fue determinado utilizando la metodología Kawade (Grossberg et al., 2001b; y Lallemand et al., 2008) que determina el recíproco de la dilución de anticuerpos que reduce la actividad IFN de 10 a 1,0 LU/ml y expresada como TRU/ml tal como se describe en Materiales y Métodos. Los títulos de neutralización fueron corregidos en el número real de LU/ml de IFN utilizados en el ensayo de neutralización a partir del valor obtenido en la valoración simultánea de IFN.

[0062] Las Figuras 20A-20C son gráficos que comparan la determinación del título neutralizante utilizando diferentes métodos/ensayos. El título neutralizante de una serie de sueros humanos fue determinado por el método de anticuerpos constantes utilizando el ensayo de gen indicador y los resultados fueron comparados con los obtenidos para los mismos sueros determinados utilizando el ensayo de una fase (Figura 20A). El título neutralizante de la misma serie de sueros humanos fue determinado por el método IFN constante utilizando el ensayo CPE tal como se describe en Materiales y Métodos y los resultados fueron comparados con los obtenidos para los mismos sueros determinados utilizando el ensayo de gen indicador y el método de anticuerpos constantes (Figura 20B). El título neutralizante de la misma serie de sueros humanos fue determinado por el método IFN constante utilizando el ensayo CPE tal como se describe en Materiales y Métodos y los resultados fueron comparados con los obtenidos para los mismos sueros determinados utilizando el ensayo de una fase (Figura 20B).

Descripción detallada de la invención

[0063] Los ensayos convencionales basados en células para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) son imprecisos, dan resultados variables y a menudo requieren dos o más días para ser completados. Además, los ensayos convencionales basados en células requieren personal especializado e instalaciones de contención biológica, son trabajosos y difíciles de automatizar. El uso de células congeladas con división detenida transfectadas con un gen indicador controlado por un promotor quimérico de respuesta a ligando (WO 2004/039990 y US 2004/023517) en un ensayo de anticuerpos neutralizantes permitiría cuantificar NAb anti-ligando con precisión en pocas horas. Aunque dicho ensayo superaría muchas de las limitaciones de los ensayos de neutralización basados en células convencionales, seguiría siendo relativamente trabajoso y requeriría incluir en el ensayo diluciones seriadas de la muestra de prueba y del ligando, controles positivo y negativo y reactivos de referencia. Además, la precisión del ensayo se ve negativamente afectada por la pérdida de células de ensayo (o excedente de ligando o NAb después de la dilución seriada). Dichos ensayos también siguen siendo relativamente difíciles de automatizar.

[0064] La presente invención evita las limitaciones de los ensayos actualmente disponibles como se ha indicado más arriba desarrollando una célula, y un ensayo para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes basado en el uso de dicha célula, que ha sido manipulada para expresar y secretar el ligando (ligando extracelular) de interés y un gen indicador transcrito a partir del mismo promotor inducible. La célula también contiene otro gen indicador controlado por un promotor quimérico que responde al ligando. La expresión del antiguo producto génico indicador es estrictamente proporcional a la expresión del ligando y permite cuantificar la expresión del ligando (es decir, determinando la cantidad de producto génico indicador expresado). La expresión del último gen indicador de respuesta a ligando también permite cuantificar la actividad del ligando. La presencia de NABs anti-ligando en el entorno inmediato de la célula neutralizará una cantidad de ligando extracelular (secretado de la célula) proporcional a la capacidad de neutralización del anticuerpo, e impedirá así que el ligando extracelular interactúe con su receptor de superficie celular específico (o con un receptor de reconocimiento de patrones). Ello tendrá como resultado la correspondiente reducción de la actividad del ligando extracelular, y por tanto la expresión del gen indicador de respuesta a ligando, cuya actividad puede ser cuantificada. La Figura 2 ilustra esquemáticamente este sistema utilizando niveles de actividad de la luciferasa de luciérnaga (FL) y de la luciferasa de renilla (RL).

[0065] El grado de reducción de la expresión del gen indicador de respuesta a ligando en presencia o ausencia de la muestra de NAB a cuantificar permitirá cuantificar el título neutralizante relativo de la muestra, relativo a un nivel dado de expresión de un gen indicador diferente transcrito del mismo promotor que el ligando.

[0066] La célula y el método de ensayo basado en células (denominado "NanoLite" a diferencia del método de ensayo "iLite" de W02004/039990 y US2004/023517) según la presente invención, cuando se utilizan para determinar anticuerpos neutralizantes, tienen muchas ventajas sobre el ensayo convencional basado en células (es decir, CPE) e incluso sobre el ensayo más reciente basado en células "iLite" ya que es esencialmente un ensayo de una fase (en el que solo se necesita añadir a las células una muestra sin diluir). La Figura 1 presenta una comparación de diagrama de flujo entre el reciente ensayo basado en células iLite y el ensayo NanoLite de la presente invención que muestra claramente que el NanoLite implica menos fases y menos tiempo. Debe tenerse en cuenta que el ensayo NanoLite según la presente invención, utilizando la célula de la presente invención, es un ensayo de una fase en el que, a diferencia de los ensayos iLite u otros ensayos convencionales, no se requiere ni la adición de ligando (citocina) ni la dilución de la muestra. La Tabla 1 resume las muchas ventajas del método de ensayo NanoLite de la presente invención sobre los ensayos CPE e iLite.

Tabla 1

	CPE	iLite	Nano Lite
Tiempo (horas)	96	18	5
Reactivos requeridos	+	+	-
Diluciones seriadas	+	+	-
Control positivo	+	+	-
Control negativo	+	+	-
Curva estándar de ligandos	+	+	-
Resultados / Número de célula	+	+	-
Muestras máximas / placa	10	10	96
HTS automático	-	+/-	+

[0067] Según los presentes inventores, la célula de la presente invención, para ser usada en la determinación de anticuerpos contra un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de la célula, contiene al menos (a) un primer constructo de ADN, que tiene una secuencia que incluye una primera serie de uno o más elementos de control de transcripción que es inducible por el ligando, y una parte que codifica una primera etiqueta mensurable (es decir, producto génico indicador) promovida por la primera serie de uno o más elementos de control de transcripción, donde la primera etiqueta puede ser detectada cuando la primera serie de uno o más elementos de control de transcripción es inducida por el ligando, (b) un segundo constructo de ADN que tiene una secuencia que incluye (i) una segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción diferente de la primera, (ii) un segmento de ADN, activado por la segunda serie de una o más etiquetas mensurables (es decir segundo producto génico indicador diferente del primero) que puede ser independientemente medido en presencia de la primera etiqueta y viceversa y (iii) en un cistón separado, un segmento de ADN que codifica el ligando, también activado por la segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción.

[0068] La célula según la presente invención puede ser una línea de células aviar o de mamífero, teniendo preferencia las células humanas. Las líneas de células preferentes incluyen sin ánimo exhaustivo, líneas de células humanas de promonocitos (es decir, U937), mieloides (es decir, U266R), linfoma de células T (es decir, Jurkatt), adenocarcinoma de mama (es decir, MCF7) y linfoma de ratón (es decir, L120) y líneas de células de leucemia eritroide.

[0069] El ligando extracelular (o su antagonista/anticuerpo), para el cual se determina el título de anticuerpos neutralizantes en el método según la presente invención del que se trata más adelante, está destinado a abarcar cualquier agente terapéutico, como proteínas terapéuticas, que activa (o bloquea, en el caso de un antagonista

de/anticuerpo contra el ligando extracelular) la actividad de transducción de señal de una proteína de superficie celular, y para el que los anticuerpos neutralizantes generados de la misma en el sujeto mamífero tratado con el agente terapéutico serían indeseables. El ligando extracelular también puede abarcar componentes de moléculas o preparaciones tales como virus vivos o atenuados o vacunas bacterianas, cuyos componentes interactúan con receptores de reconocimiento de patrones. Ejemplos preferentes no excluyentes de ese ligando extracelular incluyen citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, como interferon- α , interferon- β , interferon- γ , eritropoietina (EPO), TNF α , interleucinas, hormona del crecimiento, factor de estimulación de la colonia de granulocitos (GM-CSF); gonadotropinas, insulina y otras hormonas; integrinas; inmunoglobulinas (policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas o de cadena sencilla, etc.) y otras proteínas que interactúan con una molécula de superficie celular o con un receptor de reconocimiento de patrón para transmitir una señal al núcleo. Ejemplos no excluyentes de antagonistas (es decir, anticuerpos) del ligando extracelular, al que se fijan los anticuerpos neutralizantes, incluyen antagonistas de TNF α como Enbrel y Infliximab (un anticuerpo quimérico), Adalimumab (un anticuerpo totalmente humano) y Etanercept (una proteína de fusión del receptor IgGIFc TNFp75).

[0070] Los ensayos de anticuerpos neutralizantes (NAb) son muy importantes clínicamente hoy porque aquellos pacientes que son tratados continuamente de una enfermedad crónica, como la EM recurrente/remitente tratada con interferón, dejan de obtener beneficios del tratamiento con el agente terapéutico una vez que se ha producido una respuesta inmune, en particular la producción de NAb, contra el agente terapéutico por parte del paciente. Por lo tanto, es importante ser capaces de detectar cuándo y si un paciente ha desarrollado NAb a fin de detener el tratamiento en ese punto. Igualmente, impediría la posibilidad de reacciones adversas como choque anafiláctico y reacciones a la perfusión, y permitiría al paciente ser tratado con una terapia eficaz alternativa. Además, las pruebas NAb pueden aportar considerables ahorros de costes al asegurador/proveedor de atención sanitaria y al paciente al evitar el uso continuado de un biofarmacéutico caro e ineficaz.

[0071] La proteína de superficie celular a partir de cuya actividad de transducción de señal, en respuesta a una señal extracelular de un agente o proteína terapéuticos, se regula la expresión de un producto génico indicador puede ser cualquier proteína de superficie celular que sea conocida por los expertos en la técnica o que pueda ser identificada por los expertos en la técnica. Proteínas de superficie celular incluyen, sin ánimo exhaustivo, receptores de superficie celular y canales de iones. Ejemplos no excluyentes de receptores de superficie celular incluyen receptores de citocinas (por ej. receptores para interferón tipo I, interferón tipo II, interleucinas, hormona del crecimiento, eritropoietina (EPO), factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), TNF α , TGF β , ligando Fas, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), etc.), receptores de factores de crecimiento, receptores de antígenos, receptores de complementos y neuroreceptores. El texto de referencia, J.M. Cruse y Robert E. Lewis, Atlas of Immunology, CRC Press, Washington, DC, 1999, revela muchos receptores implicados en la respuesta inmunitaria e interacciones del sistema inmunitario. Los receptores de superficie celular también incluyen, sin ánimo exhaustivo, receptores muscarínicos (por ej., M2 humano (entrada en GenBank #M16404); M3 de rata (entrada en GenBank # M16407); M4 humano (entrada GenBank # M16405); M5 humano (Bonner et al., 1988); y similares); receptores de acetilcolina nicotínica neuronal (por ej., subtipos $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 2$); 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 $\beta 3$ de rata (Deneris et al., 1989); la subunidad $\beta 4$ de rata (Duvoisin et al., 1989); combinaciones de subunidades α de rata; subunidades β y subunidades α y β ; receptores GABA (por ej. subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ bovinas (Schofield et al. 1987); 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.Dm 1989); y similares); receptores de glutamato (por ej. receptor aislado de cerebro de rata (Hollmann et al., 1989); y similares); receptores adrenérgicos (por ej. $\beta 1$ humano (Friele et al., 1987); $\alpha 2$ humano (Kobilka et al., 1987); hámster (32 (Dixon et al., 1986); y similares); receptores de dopamina (por ej. D2 humano (Stormann et al., 1990); rata (Bunzow et al., 1988); y similares); receptores NGF (por ej. receptores NGF humanos (Johnson et al., 1986); y similares); receptores de serotonina (por ej. 5HT1a (Kobilka et al., 1987); 5HT2 de rata (Julius et al., 1990); 5HT1c de rata (Julius et al., 1988); y similares).

[0072] El receptor de reconocimiento de patrones del que su actividad de transducción de señal, en respuesta a una señal extracelular de un componente de una molécula o preparación como virus atenuado o vivo o vacuna bacteriana regula la expresión de un producto génico indicador, incluye sin ánimo exhaustivo receptores tipo Toll (TLR), receptores de membrana endosomal y de superficie celular (Uematsu y Akira, 2007) o las proteínas receptoras citosólicas de tipo gen I (GIG-I) inducibles por ácido retinoico RIG-I, MDA5, y LGP2 (Yoneyama y Fujita, 2007) que reconocen o interactúan con componentes de virus atenuados o vivos o vacunas bacterianas. La evaluación de anticuerpos neutralizantes generados en el sujeto mamífero tratado con la vacuna es importante para determinar el grado de protección conseguido por vacunación.

[0073] Trece miembros de la familia TLR han sido identificados en mamíferos (Uematsu y Akira, 2007). Cada TLR media en una respuesta característica en asociación con diferentes combinaciones de cuatro proteínas adaptadoras que contienen dominio (TIR) receptores Toll/IL-1 (MyD88, TRIF, TIRAP/MAL, y TRAM). Todos los TLRs excepto TLR3 interactúan con MyD88. TLR3, que reconoce ARN viral de una cadena o de doble cadena, está localizado en los endosomas de DCs mieloides y requiere la acidificación de vesículas para su activación. TLR3 señaliza vía TRIF y activa TBK1/IKK ϵ que fosforila el factor regulador de interferones 3 (IRF3) y NF κ B, con el resultado de producción

de IFN β (Hemmi et al, 2004, Perry et al., 2004). Las proteínas receptoras de tipo RIG-I son helicasas de ARN DExD/H box dos de las cuales, RIG-I y MDA5, comportan activación de caspasa.

[0074] Los canales de iones incluyen, pero de manera no excluyente, canales de iones de calcio (por ej. subunidad $\alpha 2$ neuronal humana (ver W089/09834); subunidad $\alpha 1$ músculo esquelético de conejo (Tanabe et al. 1987); subunidad $\alpha 2$ músculo esquelético de conejo (Ellis et al., 1988); subunidad β músculo esquelético de conejo (Ruth et al., 1989); subunidad γ músculo esquelético de conejo (Jay et al., 1990); y similares); canales de iones de potasio (por ej. cerebro de rata (BK2) (McKinnon, D., 1989); cerebro de ratón (BK1) (Tempel et al., 1988); y similares); canales de iones de sodio (por ej. cerebro de rata I y II (Noda et al., 1986); cerebro de rata III (Kayano et al., 1988); y otros).

[0075] Será apreciado por los expertos en la técnica que la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones indicados más arriba sean preferentemente endógenos a la célula de la presente invención. Sin embargo, también será apreciado que la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones puedan ser expresados a partir de ADN clonado, para complementar el número de receptores de reconocimiento de patrones o el número de proteínas de superficie celular en la superficie de la célula, o la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones puedan ser expresados a partir de ADN clonado pero es una proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones que es heterólogo para la célula anfitriona.

[0076] Para la transducción de señal, la señal intracelular que es transducida es iniciada por la interacción específica de una señal extracelular con un receptor o un canal de iones presente en la superficie de la célula. Esta interacción pone en movimiento una cascada de eventos intracelulares, incluyendo una señal específica del ligando en el núcleo de la célula, cuya consecuencia última es un cambio rápido y detectable en la expresión del producto génico, que en la célula de la presente invención es preferentemente un producto génico indicador. La señal extracelular o molécula efectora es cualquier compuesto o sustancia que actúa como ligando para alterar específicamente la actividad de una proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones. Ejemplos de dichas señales incluyen, sin ánimo excluyente, moléculas como citocinas (es decir, interferones), factores de crecimiento, hormonas, endorfinas, neurotransmisores, acetilcolina y sustancias mitogénicas, como acetato de forbol mirístico (PMA), que se fijan a receptores de superficie celular y canales de iones y modulan la actividad de dichos receptores y canales. Otros ejemplos incluyen componentes de virus atenuados y vivos y vacunas bacterianas.

[0077] Los constructos de ADN transportados por la célula según la presente invención son constructos de ADN que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico indicador operativamente unido a elementos/secuencias de control transcripcional. La transcripción del gen indicador está controlada por estas secuencias. La actividad de al menos una o más de estas secuencias de control está directa o indirectamente regulada por la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones. Las secuencias de control transcripcional incluyen sin ánimo exhaustivo promotores y otras regiones reguladoras, como secuencias potenciadoras y sitios de fijación de activadores y represores, que modulan la actividad del promotor o secuencias de control que modulan la actividad o eficiencia de la polimerasa de ARN que reconoce al promotor, o secuencias de control que son reconocidas por moléculas efectoras, incluyendo aquellas que son específicamente inducidas por interacción de una señal extracelular con una proteína de superficie celular o un receptor de reconocimiento de patrones. Por ejemplo, la modulación de la actividad del promotor puede verse afectada por la alteración de la unión de la polimerasa de ARN a la región promotora, o, de manera alternativa, por interferir en el inicio de transcripción o extensión del mRNA. Tales secuencias son denominadas colectivamente aquí como elementos o secuencias de control transcripcional. Además, los constructos pueden incluir secuencias de nucleótidos que alteran la translación del mRNA resultante, alterando así la cantidad de producto génico indicador expresado.

[0078] Un promotor que es regulado o mediado por la actividad de una proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones es un promotor cuya actividad cambia cuando una célula es expuesta a una señal extracelular particular (ligando) en virtud de la presencia de proteínas de superficie celular o receptores de reconocimiento de patrones cuyas actividades se ven afectadas por la señal extracelular. Por ejemplo, el promotor c-fos es específicamente activado por la interacción específica de ciertas señales extracelulares, como hormonas de crecimiento, con una proteína de superficie celular, como un receptor de hormona de crecimiento. En particular, la regulación de tales promotores por la proteína de superficie celular, aunque indirecta, se produce a los pocos minutos de la interacción de la proteína de superficie celular con la señal extracelular. Como se utiliza aquí, el acoplamiento operativo se refiere al acoplamiento de un elemento de control transcripcional, es decir, un promotor, a una secuencia de codificación de nucleótidos de manera que el elemento de control transcripcional queda correctamente posicionado para su actividad de fijarse a polimerasa de ARN e iniciar la transcripción de la secuencia de codificación de nucleótidos. Por lo tanto, una secuencia de codificación de nucleótidos en acoplamiento operativo con un promotor se produce aguas abajo, con respecto a la dirección de transcripción del promotor, está en el marco de lectura correcto con respecto al sitio de inicio de transcripción e insertado de manera que la extensión de la transcripción transcurre a través de la secuencia de codificación de nucleótidos.

[0079] Se puede obtener o derivar elementos de control transcripcional adecuados de las regiones reguladoras transcripcionales de genes cuya expresión es inducida rápidamente, por lo general a los pocos minutos de contacto

entre la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones y el ligando efector que modula la actividad de la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones. Ejemplos de dichos genes incluyen pero no se limitan a los genes de expresión rápida (Sheng et al., 1990), como c-fos. Los genes de expresión rápida son genes que son rápidamente inducidos al unir un ligando a una proteína de superficie celular. Los elementos de control transcripcional que son preferibles para utilizar en los constructos de ADN (gen indicador) incluyen elementos de control transcripcional de genes de expresión rápida, elementos derivados de otros genes que exhiben algunas o todas las características de genes de expresión temprana, o elementos sintéticos que se construyen de forma que dichos genes en acoplamiento operativo exhiban dichas características. Las características de genes preferidos a partir de los cuales se derivan elementos de control transcripcional incluyen, sin ánimo exhaustivo, expresión baja o indetectable en células quiescentes, inducción rápida a nivel transcripcional a los pocos minutos de estimulación extracelular, inducción que es pasajera e independiente de nuevas síntesis de proteínas, la detención subsiguiente de la transcripción requiere nueva síntesis de proteínas y mARNs transcritos a partir de estos genes tienen una vida media corta. No es necesario que estén presentes todas estas propiedades.

[0080] Promotores y elementos de control transcripcional adecuados incluyen, pero sin ánimo exhaustivo, el promotor citomegalovirus (CMV), promotor de virus de simio 40 (SV40) y promotores mínimos del mismo, el promotor génico del péptido intestinal vasoactivo (VIP) (de respuesta a cAMP; Fink et al., 1988); el promotor génico de somatostatina (de respuesta a cAMP; Montminy et al., 1986); el promotor de proencefalina (de respuesta a cAMP, agonistas nicotínicos y ésteres de forbol; Comb et al., 1986); el promotor génico fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (de respuesta a cAMP; Short et al., 1986); el promotor génico NGFI-A (de respuesta a NGF, cAMP y suero; Changelian et al., 1989); los elementos de control transcripcional obtenidos o derivados del gen c-fos; y otros que pueden ser conocidos o preparados por los expertos en el campo.

[0081] El protooncogén c-fos es el homólogo celular del gen transformador del virus del osteosarcoma FBJ. Codifica una proteína nuclear que participa muy probablemente en el crecimiento y diferenciación celular normal. La transcripción de c-fos es rápida y transitoriamente activada por factores de crecimiento y por inductores de otras proteínas de superficie celular, incluyendo hormonas, agentes específicos de diferenciación, estrés, mitógenos y otros inductores conocidos de proteínas de superficie celular. La activación es independiente de la síntesis de proteínas. Los elementos reguladores de c-fos incluyen un TATA box necesario para iniciar la transcripción, dos elementos ascendentes para transcripción basal y un potenciador, que incluye un elemento con simetría diádica y que es necesario para inducción por TPA, suero, EGF y PMA. El elemento potenciador transcripcional 20 bp situado entre -317 y -298 corriente arriba del sitio cap mARN de c-fos, que es esencial para la inducción del suero en células NIH 3T3 privadas de suero. Uno de los dos elementos corriente arriba está situado en -63 y -57 y se parece a la secuencia de consenso para la regulación de cAMP.

[0082] Los elementos de control transcripcional, particularmente cuando se refieren a un modo de realización preferente de la presente invención donde el interferón de tipo I y/o tipo II es la señal extracelular, son preferentemente un elemento de respuesta a la estimulación con IFN (ISRE) y/o una secuencia activada por gamma (GAS). Hay una serie de ISREs caracterizados a partir de diferentes genes humanos que responden a interferón de tipo I y una secuencia de consenso, ggaaagwGAAActg /SEQ ID NO: 1; las letras mayúsculas denotan la secuencia principal; lo subrayado alta conservación), a la que se une el complejo STAT1/STAT2/IRF9, fue identificada para ISRE (Levy et al., 1988). Un ISRE preferente procede del gen humano ISG15 y se presenta como SEQ ID NO: 2 donde los nucleótidos 41-55 corresponden a la secuencia ISRE de consenso. ISRE es también altamente conservado entre especies. Por ejemplo, una secuencia presente en la región promotora del gen Mx de pollo inducible por interferón (Schumacher et al., 1994) es similar a la encontrada en primates y se conforma a la secuencia de consenso ISRE para genes de respuesta al interferón de mamíferos incluyendo roedores y vacas (ver Fig. 2 de Perry et al., 1999).

[0083] Con respecto a GAS, a la que se une el homodímero STAT1 en genes de respuesta a interferón tipo II, se identificó una secuencia de consenso, nnnsanttccgGGAAntgnsn (SEQ ID NO: 3; letras mayúsculas denotan secuencia central; lo subrayado denota alta conservación); a partir de muchas secuencias de fijación seleccionadas (Horvath et al, 1995).

[0084] En el ejemplo en el que el interferón de tipo I o de tipo II es la señal de ligando extracelular, una combinación preferente de elementos de control transcripcional es un promotor quimérico de respuesta a interferón en el que un ISRE y/o GAS controla un promotor mínimo SV40 operativamente acoplado a una secuencia de nucleótidos que codifica un primer producto génico indicador como primera etiqueta mensurable.

[0085] Cuando el ligando extracelular es TNF α , una combinación preferente de elementos de control transcripcional es un promotor quimérico de respuesta a TNF α en el que repeticiones (es decir, 5 repeticiones en tándem; SEQ ID NO: 11) del sitio de reconocimiento de NF κ B controla un promotor mínimo SV40 operativamente acoplado a una secuencia de nucleótidos que codifica un primer producto génico indicador.

[0086] Cuando el ligando extracelular es eritropoyetina (EPO), una combinación preferente de elementos de control transcripcional es un promotor quimérico de respuesta a EPO en que repeticiones del transductor de señal y activador de secuencia de transcripción #5 (STAT5) (5 repeticiones en tándem) es

tcgagTTCGAAGAAaacTTCTTGGAaGgTTCCTGGAGcTTCTAG GAAgaTTCCGGGAA (SEQ ID NO: 4), donde la secuencia en letras mayúsculas representa variantes de la secuencia de consenso STAT5), a través de la cual EPO envía señales desde su receptor de superficie celular al núcleo, controla un promotor mínimo SV40 operativamente acoplado a una secuencia de nucleótidos que codifica como un primer producto génico indicador.

[0087] El primer producto génico indicador (también conocido aquí como primera etiqueta mensurable), cuyo nivel es una medida de la presencia y/o del nivel de un ligando extracelular que activa la actividad de transducción de señal de una proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones, puede ser ARN o proteína, siempre que sean fácilmente detectables, aunque es preferible una proteína. Por ejemplo, las luciferasas, como la luciferasa de luciérnaga, luciferasa de renilla, luciferasa Gaussia y luciferasa Metridia, la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y aequorina de medusa son modos de realización preferentes de productos génicos indicadores (etiquetas mensurables) en la célula según la presente invención. En el caso de las enzimas luciferasa de luciérnaga (deWet et al., 1987) y otras luciferasas y aequorina de medusa (Rider et al., 2003), el resultado de su actividad enzimática, la luz, es detectada y medida con un luminómetro, mientras que en el caso de EGFP, se puede utilizar un analizador o distribuidor celular activado por fluorescencia (FACS) que puede ser utilizado a una 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, aequorina o EGFP expresada en una muestra de células estará determinada por la cantidad de ligando al que está expuesta la célula en el entorno externo inmediato que rodea la célula. Ejemplos no excluyentes de otros productos génicos indicadores adecuados incluyen dsRED, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Alton et al., 1979) otros sistemas de detección de enzimas, como β -galactosidasa, luciferasa bacteriana (Engbrecht et al., 1984 y Baldwin et al., 1984), fosfatasa alcalina (Toh et al. 1989) y Hall et al. 1983), y β -lactamasa bacteriana o humanizada (Zlokarnik et al., 1998).

[0088] El segundo producto génico indicador (también conocido como segunda etiqueta mensurable), cuyo nivel es una medida del nivel del ligando, expresado junto con el segundo producto génico indicador (y en un cistón separado del mismo promotor) y secretado en el entorno externo inmediato que rodea la célula y siendo capaz dicho ligando de activar la actividad de transducción de señal de un receptor/proteína de superficie o un receptor de reconocimiento de patrones. El segundo producto génico indicador puede ser cualquiera de los mencionados arriba con respecto al primer producto génico indicador salvo en que el primero y segundo productos génicos indicadores deben ser diferentes entre sí para que un producto génico indicador pueda ser medido independientemente en presencia del otro, y viceversa. El término "cistón" se utiliza con el significado normalmente entendido en la técnica como un segmento de ADN que codifica un único polipéptido pero expresado a partir de la misma serie de uno o más elementos de control de transcripción (es decir, promotor) que el segundo producto génico indicador.

[0089] Cuando la célula se va a utilizar para determinar anticuerpos neutralizantes en un antagonista/anticuerpo de un ligando (por ej. antagonistas de TNF α como Eubrel, Infliximab, Adalimumab, Etanercept, etc.), la célula llevará además un tercer constructo que incluye un segmento que codifica un tercer producto génico indicador (tercera etiqueta mensurable) impulsado por una tercera serie de uno o más elementos de control de transcripción diferente de la primera y segunda serie de elementos de control de transcripción en el primer y segundo constructos. Este producto génico indicador se expresa junto con un antagonista de ligando (en un cistón separado promovido por el mismo promotor/elementos de control de transcripción) y cuyo nivel es una medida del nivel del antagonista de ligando expresado. El antagonista de ligando es expresado y secretado en el entorno externo inmediato que rodea la célula junto con el ligando expresado por el segundo constructo. El nivel de actividad de ligando mensurable es una medida de la cantidad de anticuerpos neutralizantes del antagonista de ligando que impiden al antagonista de ligando inhibir la actividad de señalización del ligando. El tercer producto génico indicador puede ser cualquiera de los mencionados arriba con respecto al primero y segundo productos génicos indicadores, incluyendo preferentemente un gen indicador CBG68Luc, salvo en que el tercer producto génico indicador y el primero y segundo productos génicos indicadores deben ser diferentes entre sí para que cada producto génico indicador pueda ser medido de forma independiente en presencia de los otros dos.

[0090] En el caso de ligandos extracelulares que inhiben la proliferación de células, inducen apoptosis o inducen la regulación negativa del receptor, la expresión del ligando es controlada por una serie de uno o más elementos de control de transcripción que es inducible (es decir, no hay expresión a menos que haya un inductor presente). Ello impediría la actividad inhibitoria indeseable del ligando extracelular mientras la célula está creciendo o antes de que la célula esté lista para ser utilizada en un ensayo basado en células. Otro ejemplo en el que los elementos de control de transcripción inducibles son deseables para expresar el ligando es cuando la célula se utiliza en un ensayo basado en células en el que se trata de determinar solo el nivel del ligando extracelular en una muestra, sin que dicho ligando sea producido a partir de la segunda serie de uno o más elementos de control de transcripción, en lugar del nivel de anticuerpos neutralizantes del ligando extracelular. En caso de que un antagonista de ligando deba ser expresado en un antagonista de ligando debe ser expresado en un tercer constructo, la expresión del antagonista de ligando se controla preferentemente por una serie de uno o más elementos de control de transcripción que es inducible.

[0091] Promotores inducibles y otros elementos de control transcripcional, algunos de los cuales se mencionan más arriba, son bien conocidos en el sector. Un elemento preferente de control transcripcional inducible bien conocido para su uso en el control de la expresión del ligando y un producto génico indicador es un elemento de respuesta a

tetraciclina del sistema de expresión génica Tet-On/Tet-Off (como el de Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Este elemento, al que se fija un represor de tetraciclina inverso (rTetR; un versión mutada del represor de tetraciclina), inhibiendo así la transcripción de la construcción Tet-On, se coloca corriente arriba de un promotor mínimo preferentemente, como el promotor mínimo de expresión rápida del citomegalovirus (CMV). En presencia de un inductor, por ej., tetraciclina o doxiciclina, la versión mutada del TetR (rTetR) se convierte en un transactivador inverso controlado por tetraciclina (rtTA) y se fija a TRE permitiendo que comience la transcripción.

[0092] En otro modo de realización, el promotor inducible es un promotor Tet-Off en el que el TetR se fija a TRE, silenciando la transcripción en presencia de tetraciclina o doxiciclina. Después de la eliminación de tetraciclina o doxiciclina, el transactivador controlado por tetraciclina (tTA) se fija a TRE, activando así la transcripción.

[0093] Un modo de realización de la célula según la presente invención deriva de la línea celular promonocítica humana U937 transfectada con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga controlado por un promotor quimérico de respuesta a interferón que contiene un promotor mínimo SV40 y el ISRE del gen ISG 15 tal como se ha descrito previamente en WO 2004/039990 y US 2004/023517, que se incorporan aquí como referencia y se muestra en la Fig. 3. Estas células fueron transfectadas a continuación con el vector 5991 bp pIRES/IFNA2/hRL (SEQ ID NO: 5) que comprende la secuencia de codificación del gen IFN α 2a (nucleótidos 1-586 de SEQ ID NO:5), IRES (Internal Ribosome Entry Site; SEQ ID NO: 6) de citomegalovirus (CMV), junto con la secuencia de codificación del gen indicador de luciferasa de renilla (nucleótidos 1532-2484 de SEQ ID NO:5), bajo el control de un promotor CMV constitutivo (nucleótidos 5282-5991 de SEQ ID NO: 1) tal como se indica en la Fig. 3. Por lo tanto, esta construcción permite que la transcripción de ARN primario sea trasladada a dos proteínas nativas distintas (IFN α 2a y luciferasa de Renilla) para conservar la estructura terciaria de la proteína IFN α 2a humana y por lo tanto, su reconocimiento por anticuerpos anti-IFN α .

[0094] En un modo de realización preferente de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de Renilla fue clonado corriente arriba del IRES y el gen IFN α 2a humano (Fig. 4) a fin de incrementar los bajos niveles de expresión génica de renilla observados cuando el gen IFN α 2a humano u otros genes IFN tipo I humanos (es decir, IFN β), fue clonado corriente arriba del gen indicador de luciferasa de renilla.

[0095] En un segundo modo preferente de realización de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de renilla y el gen IFN α 2a humano fueron expresados bajo el control de un promotor inducible a fin de impedir que la expresión continuada de IFNs tipo I humanos inhibiera la proliferación celular y por lo tanto impidiera el cultivo de la línea celular transfectada. Por lo tanto, el gen indicador de luciferasa de renilla y el gen IFN α 2a humano fueron expresados bajo el control de un promotor CMV (Fig. 5), cuya expresión es inducida en presencia de doxiciclina o tetraciclina (Tet-On).

[0096] En un tercer modo preferente de realización de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de renilla y el gen IFN β 1a humano fueron expresados bajo el control de un promotor CMV Tet-On (Fig. 6).

[0097] En otro modo de realización de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de renilla y el gen TNF α humano fueron expresados bajo el control de un promotor CMV Tet-On (Fig. 7). El uso de un promotor inducible es esencial para la expresión del TNF α , cuya producción incontrolada induciría apoptosis en las células anfitrionas sensibles a TNF α . La secuencia de 5 repeticiones en tándem del sitio de reconocimiento NF κ B canónico utilizado en el otro constructo en la Fig. 7 para promover la expresión de luciferasa de luciérnaga en combinación con un promotor mínimo SV40 es SEQ ID NO: 11.

[0098] En otro modo más de realización de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de renilla y el gen de eritropoyetina humano son expresados bajo el control de un promotor CMV Tet-On (Fig. 9). El uso de un promotor inducible es esencial para la expresión de EPO, cuya producción continua provocaría regulación negativa de receptores específicos de EPO en las células anfitrionas sensibles a EPO.

[0099] En otro modo más de realización de la célula de la presente invención, el gen indicador de luciferasa de renilla se expresa bajo el control de un promotor quimérico consistente en 5 repeticiones en tándem del sitio de reconocimiento NF κ B canónico/promotor mínimo SV40. Además, el gen indicador CBRLuc y TNF α se expresan ambos bajo el control de un elemento de respuesta a Tet (TRE)/promotor mínimo de expresión rápida CMV (Tet-On) como segundo constructo, y el antagonista TNF α de interés y el gen indicador CBG68Luc se expresan en un tercer constructo bajo el control de un promotor inducible diferente como el promotor inducible de mifepristona quimérico. En este sistema, la secuencia TATA y GAL4-UAS se expresan a partir del promotor mínimo E1b Adenovirus que es transcripcionalmente silencioso a falta de activación. El dominio de fijación al ADN Gal4 que une la proteína reguladora al promotor GAL4-E1b y el dominio de fijación al ligando receptor de progesterona humana truncado (hPR-LBD) que experimenta un cambio de conformación cuando fija la mifepristona antagonista de progesterona se expresan a partir de un promotor TK mínimo en el vector. Por lo tanto, al añadir mifepristona, el antagonista se fija a la región hPR-LBD del vector provocando un cambio de conformación en la proteína reguladora con el resultado de la transcripción del antagonista TNF α y el gen indicador CBG68Luc (Fig. 8).

[00100] A fin de hacer que la célula según la presente invención sea de un solo uso que no pueda ser propagada

para más usos, la célula (después de haber sido transformada/transfectada con el primero, segundo y opcionalmente, tercer constructo de ADN) se trata con un agente pro-apoptótico o anti-mitótico para que adquiera la propiedad que mantendrá la actividad de transducción de señal específica del ligando durante al menos 1 hora pero no más de aproximadamente 30 días a una temperatura por encima del punto de congelación antes de perder la actividad de transducción de señal y sufrir la muerte celular.

[00101] Un modo de realización preferente de la presente invención es cuando el agente pro-apoptótico o anti-mitótico es radiación gamma y la célula ha sido tratada por irradiación con radiación gamma a una intensidad y durante el tiempo suficiente para que la célula irradiada mantenga actividad de transducción de señal de un receptor/proteína de superficie celular o un receptor de reconocimiento de patrón durante un periodo de al menos 1 hora, preferiblemente 7 días pero no más de 30 días a una temperatura por encima del punto de congelación después de irradiación, y tras dicho periodo la célula irradiada sufre inmediatamente muerte celular (es decir, apoptosis).

[00102] Es sabido que la irradiación gamma en altas dosis provoca que una célula pierda su actividad de transducción de señal. La irradiación a una dosis algo menor provoca que una célula deje de replicarse y sufra muerte celular. Los presentes inventores descubrieron previamente que es posible determinar una dosis que inhiba la replicación pero que siga permitiendo a la célula mantener su actividad de transducción de señal durante un periodo de tiempo antes de sufrir muerte celular. Por ejemplo, la radiación gamma a aproximadamente 9 Grays permite a las células U937 mantener la actividad de transducción de señal durante 14 días después de los cuales las células sufren muerte celular. Sin embargo, durante esos 14 días, la actividad de transducción de señal como respuesta a, por ejemplo, interferón de tipo I que está siendo determinada funciona como en un control no irradiado. Por lo tanto, al irradiar una célula con radiación gamma, la célula tratada tiene una vida media de 14 días, pero se vuelve inactiva (sufrir muerte celular) después de un periodo de 14 días para que no pueda ser conservada ni reproducida por un usuario final. La dosis de irradiación gamma requerida variará como función de la línea celular particular empleada pero esto puede determinarse con experimentación rutinaria basada en las orientaciones de WO 2004/039990 y US 2004/023517.

[00103] La dosis (intensidad y duración) de radiación gamma con la que se trata la célula transformada es preferentemente de entre 6 y 12 Grays (Gy). Como lo demuestran los experimentos en WO 2004/039990 y US 2004/023517, la temperatura por encima del punto de congelación, a la que se mantiene o almacena la célula, afecta a la vida media de la célula. De manera preferente, esta temperatura es la temperatura ambiente, que mantiene ventajosamente la sensibilidad máxima del interferón proporcionando al mismo tiempo facilidad de almacenaje y transporte de la célula de un solo uso.

[00104] Un segundo modo de realización preferente de la presente invención es cuando la célula (después de haber sido transformada/transfectada con el primer, segundo y, opcionalmente, tercer constructo de ADN) es tratada con un agente químico pro-apoptótico o anti-mitótico como vinblastina, 5-fluoruracilo (5-Fu), cisplatina o un agente intercalante anti-tumoral (es decir, mitomicina C) en cantidad suficiente y durante el tiempo suficiente para que la célula así tratada mantenga la actividad de transducción de señal de la proteína de superficie celular o receptor de reconocimiento de patrones durante un periodo de al menos 1 hora pero no más de 30 días a una temperatura por encima del punto de congelación después del tratamiento con el agente, después del cual la célula tratada sufre inmediatamente muerte celular. Un agente anti-mitótico o pro-apoptótico afectará a la célula tratada cuando empieza a replicarse, impidiendo por ejemplo la formación de husillos, induciendo así la apoptosis y matando a la célula. Por lo tanto, las células que han sido tratadas con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico, como células promonocíticas humanas transformadas, tendrán una vida media de unas 24 horas durante las cuales se puede realizar el ensayo de transducción de señal y después de ese periodo de tiempo las células morirán. Se apreciará que una célula que tenga solo 24 horas de vida media no es deseable desde un punto de vista comercial. A fin de ampliar la vida media, las células tratadas pueden ser congeladas inmediatamente, y en este estado tendrán una vida media mucho más larga, dependiendo de la manera en que sean congeladas y descongeladas. Una vez descongeladas, sin embargo, deben ser utilizadas en 24 horas, periodo tras el cual sufrirán muerte celular (apoptosis).

[00105] Debe tenerse en cuenta que en la opinión convencional la crioconservación de células requiere un proceso especial de congelación y descongelación (y equipo) en el que las células se congelan a una velocidad de 1°C por minuto hasta que alcanzan -80°C o temperaturas del nitrógeno líquido de -200°C, a las que pueden ser almacenadas indefinidamente, y después de lo cual deben descongelarse muy rápidamente. A menudo también se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) u otro criopreservante para la protección de las células. Dado que la mayoría de laboratorios no tienen instalaciones de almacenamiento a -200°C o incluso a -80°C, sería útil permitir la congelación de las células a -20°C. Sin embargo, se sabe que la viabilidad celular es deficiente cuando las células se congelan a -20°C y luego se descongelan. Los presentes inventores descubrieron previamente que el DMSO protege las células incluso cuando se congelan a -20°C sin ninguna técnica o equipo especial de congelación o descongelación. Aunque el glicerol, un compuesto criopreservante conocido, protegerá las células a -20°C, existe la posibilidad de que pueda impedir que los ligandos de proteínas interactúen con receptores de superficie por el alto porcentaje de glicerol (50%) normalmente utilizado para la criopreservación. Sin embargo, se puede utilizar un porcentaje bajo de glicerol (mucho menos del 50% normalmente utilizado). El DMSO no presenta esta desventaja. El DMSO puede proteger las células congeladas a -20°C sin ninguna técnica o equipo especial de congelación o descongelación y sin afectar

negativamente a su sensibilidad a IFN. Después de ser tratada con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico, una célula puede alcanzar una larga vida media incluso temperaturas de congelación estándar de -20°C si se trata además con DMSO y una vez descongelada dicha célula seguirá estando activa, es decir, para ensayos de transducción de señales utilizados para determinar la cantidad de ligandos o anticuerpos neutralizantes del ligando o de un anticuerpo anti-ligando, durante aproximadamente 24 horas hasta que sufra apoptosis como resultado de ser tratada con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico. Cualquier agente anti-mitótico o pro-apoptótico que mate células durante el proceso de replicación al inducir apoptosis, como radiación gamma o agentes químicos como vinblastina, 5-FU, cisplatina, doxorubicina, o un agente intercalante anti-tumoral (es decir, mitomicina C) puede ser utilizado para este propósito ya que se espera que las células permanezcan biológicamente activas durante un periodo quiescente transcurrido el cual las células empiezan a morir.

[00106] La célula transformada tratada (transformada con el primero, segundo y, opcionalmente, tercer constructo de ADN) se congela a una temperatura y en condiciones tales que reanudará la transducción de señales después de la descongelación. Aunque la célula se descongela preferentemente a una temperatura entre -20°C y -200°C, más preferiblemente a -80°C, las células pueden ser posteriormente almacenadas a -20°C, una temperatura de congelación normalmente disponible en casi todos los laboratorios, se pretende que se utilicen otras temperaturas adecuadas para la criopreservación de células, como la temperatura del nitrógeno líquido de unos -200°C. Más preferentemente la célula transformada tratada es resuspendida en una solución que contenga un criopreservante antes de congelarla. El dimetilsulfóxido (DMSO) es el criopreservante preferido aunque se pueden utilizar otros criopreservantes adecuados que tengan una elevada afinidad de unión por el agua, como el etilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, butanodiol, propanediol, y formamida, siempre y cuando no afecten al uso de la célula después de la descongelación. Cuando se utiliza solo DMSO como criopreservante, la solución que contiene el DMSO contiene preferentemente un 10% aproximadamente de DMSO. De manera más preferente, se utiliza un 2,5% de DMSO combinado con un 10% de glicerol como criopreservante.

[00107] La célula según la presente invención es preferentemente una célula aviar o de mamífero, más preferentemente una célula humana y más preferentemente aún una célula promonocítica humana. Una célula promonocítica humana preferente que transporta el vector ISRE-luc que contiene el constructo de gen indicador de luciferasa de luciérnaga es una célula PIL5. Otras líneas de células preferentes incluyen sin ánimo exhaustivo, líneas de células humanas mieloides (es decir, U266R), linfoma de células T (es decir, Jurkatt), adenocarcinoma de mama (es decir, MCF7) y linfoma de ratón (es decir, L1210) y líneas de células de leucemia eritroide. La célula se trata para hacer una línea de células comercial que tenga las propiedades comercialmente deseables de una vida media suficiente a efectos del ensayo y para que sea una célula de un solo uso que no pueda ser propagada para más usos. Preferentemente, la célula se trata o bien 1) por irradiación con rayos gamma 6 12 Gy, más preferentemente 9 Gy, y almacenamiento a temperatura ambiente durante 14 días después de radiación o 2) por exposición a un agente anti-mitótico o pro-apoptótico, como vinblastina, cisplatina, o 5-fluorouracilo, más preferentemente vinblastina, durante 10 minutos a 37°C antes de resuspenderla en una solución que contenga 40% de suero bovino fetal (FBS) y 2,5% de DMSO + 10% glicerol y congelación a -80°C.

[00108] A fin de optimizar el método de obtener una célula con una vida media indefinida durante su almacenamiento congelada, pero que muera aproximadamente 24 horas después de descongelada (una vez descongelada, sin embargo, el producto tiene una sensibilidad, precisión así como selectividad excelentes), los parámetros que pueden variar en el curso de dicha optimización incluyen:

1) Concentración de FBS. Además de FBS, se puede utilizar cualquier suero ya que actúan como un sumidero tóxico para proteger a las células de las toxinas mientras están siendo descongeladas o mientras son tratadas con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico. La concentración de FBS puede provocar que los resultados varíen.

2) El tiempo es una variable. La cantidad de tiempo de exposición a un agente químico anti-mitótico o pro-apoptótico, como vinblastina, antes de que las células sean centrifugadas y lavadas para eliminar el agente (es decir, la vinblastina).

3) Al utilizar la vinblastina como un ejemplo no excluyente, la fórmula de la vinblastina es importante. Actualmente, la vinblastina soluble en una fórmula pretamponada patentada vendida por Eli Lilly con el nombre de Velbe en Francia es la utilizada de forma preferente. Una fórmula diferente puede necesitar una combinación de parámetros ligeramente diferentes.

4) La concentración de vinblastina.

5) Concentración celular durante el tratamiento con vinblastina.

6) La cantidad de criopreservante o combinación de criopreservantes.

[00109] Todos estos parámetros pueden variar empíricamente así como los resultados después de congelación relativos a sensibilidad y precisión, asumiendo que las células permanecen vivas aproximadamente 24 horas

después de descongeladas. Esto puede determinarse rápidamente por alguien con conocimientos básicos en la materia sin experimentación indebida, particularmente con las orientaciones suministradas en los experimentos que se muestran en las Figs. 11-24 para células PIL5 en WO 2004/039990 y US 2004/023517, a fin de obtener un producto que tenga sustancialmente la misma sensibilidad que las células vivas no tratadas durante un periodo de al menos una hora, preferentemente 8-24 horas, después de la descongelación pero que tengan una viabilidad de no más de 30 días, preferentemente no más de 14 días, más preferentemente no más de 5 días y más preferentemente aún no más de 3 días.

[00110] A continuación se ponen ejemplos de protocolos para la preparación de placas de ensayo de microtitulación y ampollas/viales de células PIL5 (como células modelo) tratadas con el agente anti-mitótico y pro-apoptótico vinblastina µg/ml durante 10 minutos a 37°C antes de su almacenamiento congeladas a -20°C y descongelación posterior a efectos de realizar el ensayo.

Preparación de Placas de Ensayo de Microtitulación

1. Células PIL5 a una concentración de aproximadamente 2x10⁵ a 7x10⁵ células/ml en medio de cultivo RMPI 1640 con 10% de suero bovino fetal (FBS) son tratadas con una solución fresca de 1mg/ml de vinblastina (disponible en Eli Lilly bajo la fórmula pre-tamponada VELBE), diluida en 1mg/ml de H₂O, durante 10 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Se puede utilizar una incubadora de CO₂ por comodidad.

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

3. Las células PIL5 son re-suspendidas a una concentración de 2x10⁷ células/ml en medio RMPI 1640 con 40% de suero fetal bovino (FBS) y 2,5% de dimetilsulfóxido + 10% glicerol.

4. La suspensión celular es repartida en los pocillos de una micro-placa de fondo plano para obtener 300.000 células por pocillo (equivalente a 25 ml de suspensión celular por pocillo).

5. La micro-placa se congela a -80°C en una bolsa de aluminio sellada al vacío con la tapa en lo más alto.

6. Las micro-placas pueden ser almacenadas a continuación durante periodos limitados a -20°C hasta su uso.

[00111] De manera alternativa, las células PIL5 a una concentración de 2x10⁷ células/ml en medio RMPI 1640 con 40% de suero fetal bovino (FBS) y 2,5% de dimetilsulfóxido + 10% glicerol pueden ser congeladas a -80°C o -200°C en un único o en múltiples viales criopreservantes. Inmediatamente antes del uso los viales se descongelan rápidamente y las células se distribuyen en una o más placas de microtitulación. Los viales también pueden ser preparados conteniendo suficientes células para media o un cuarto de placa de microtitulación, según sea necesario.

Preparación de Ampollas/Viales Criopreservantes

1. Células PIL5 a una concentración de aproximadamente 2x10⁵ a 7x10⁵ células/ml en medio de cultivo RMPI 1640 con 10% de suero bovino fetal (FBS) son tratadas con una solución fresca de 1mg/ml de vinblastina (disponible en Eli Lilly bajo la fórmula pre-tamponada VELBE), diluida en 1mg/ml de H₂O, durante 10 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Se puede utilizar una incubadora de CO₂ por comodidad.

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

3. Las células PIL5 son re-suspendidas a una concentración de 2x10⁷ células/ml en medio RMPI 1640 con 40% de suero fetal bovino (FBS) y 2,5% de dimetilsulfóxido + 10% glicerol.

4. La suspensión celular (1ml) es repartida en un vial criopreservante y congelado a -80%.

5. El vial criopreservante puede ser almacenado posteriormente a -20°C durante periodos limitados hasta su uso.

[00112] La presente invención también proporciona un método para utilizar una célula según la presente invención para determinar el nivel en una muestra de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo (es decir, por transducción de señal desde un receptor de superficie celular o desde un receptor de reconocimiento de patrones) o el nivel de anticuerpos neutralizantes bien contra el ligando extracelular o un antagonista contra el ligando extracelular o el nivel de una forma soluble del receptor de ligando. El método incluye incubar la célula de la presente invención en una mezcla con una muestra en la que se busca determinar el nivel del

ligando extracelular o el anticuerpo neutralizante. El nivel de la primera etiqueta mensurable (primer producto génico indicador, como luciferasa de luciérnaga en los modos de realización mostrados en los dibujos) en la muestra se determina con relación al nivel de la primera etiqueta mensurable en ausencia de la muestra para calcular el nivel en la muestra del ligando extracelular o el anticuerpo neutralizante.

[00113] La presente invención también proporciona un medio de detectar la presencia de medicamento residual en la muestra para determinar la presencia de NABs anti-medicamentos. La presencia de medicamento residual puede hacer que los resultados de los ensayos de neutralización no se puedan interpretar. En el caso de pacientes tratados con un medicamento biofarmacéutico que es, por ejemplo, una forma recombinante de una citocina como IFN β o un factor de crecimiento como EPO, la presencia del medicamento (IFN β o un factor de crecimiento) en la muestra (suero u otro fluido biológico) en la que hay que determinar la presencia de NABs anti-factor de crecimiento o anti-citocinas puede ser determinada utilizando el método de la presente invención antes de llevar a cabo el ensayo de neutralización según la presente invención simplemente incubando en primer lugar la muestra con la célula de ensayo de la presente invención durante un tiempo adecuado (3 a 6 horas). La activación de luciferasa de luciérnaga, en ausencia de adición de tetraciclina o doxiciclina, indicará la presencia de medicamento residual. El grado de activación de la luciferasa de luciérnaga permitirá cuantificar el nivel de medicamento residual. El medicamento residual puede ser eliminado a continuación mediante el procedimiento adecuado. Por ejemplo, en el caso de IFN β , el medicamento puede ser separado de cualquiera de los anticuerpos presentes en la muestra utilizando un tamiz molecular con una columna por afinidad anti-IFN β o punto límite de 20 a 30 kDa. De manera alternativa, los NABs anti-IFN pueden ser retirados de la muestra utilizando una columna por afinidad con proteínas G o proteínas A.

[00114] La muestra se puede analizar a continuación para determinar la presencia de NABs anti-IFN después de activar el constructo de luciferasa de renilla-ligando en presencia de tetraciclina o doxiciclina.

[00115] En el caso de antagonistas de TNF α como Infliximab (un anticuerpo quimérico), Adalimumab (un anticuerpo totalmente humano) o Etanercept (una proteína de fusión del receptor IgGIFC-TNFp75, la presencia de medicamento residual puede afectar a la detección de NABs contra el antagonista de TNF α . La presencia de medicamento residual en la muestra puede ser detectada utilizando el método de ensayo de una fase según la presente invención incubando simplemente la muestra de suero con las células de ensayo en presencia de tetraciclina o doxiciclina antes de la activación del constructo Infliximab inducible. En este constructo, el Infliximab que codifica ácido nucleico está bajo el control de un promotor inducible diferente del promotor Tet-On o Tet-Off. Por ejemplo, se puede emplear un promotor regulado por mifepristona como el que comercializa Invitrogen (Carlsbad, CA. En este sistema, un promotor quimérico consistente en la secuencia TATA y GAL4-UAS del promotor mínimo E1b Adenovirus es transcripcionalmente silencioso a falta de activación. El dominio de fijación al ADN Gal4 que une la proteína reguladora al promotor GAL4-Elb y el dominio de fijación al ligando receptor de progesterona humana truncado (hPR-LBD) que experimenta un cambio de conformación cuando fija la mifepristona antagonista de progesterona se expresan a partir de un promotor TK mínimo en el vector. Por lo tanto, al añadir mifepristona, el antagonista se fija a la región hPR-LBD del vector provocando un cambio de conformación en la proteína reguladora con el resultado de la transcripción del promotor GAL4-Elb.

[00116] Por lo tanto, una reducción de la señal de luciferasa de renilla inducida-TNF α regulado por Tet-on, debida a la producción de TNF α expresado endógenamente, después de añadir una muestra a las células de la presente invención, indicará la presencia del antagonista de TNF α en la muestra a examinar para determinar la presencia de NABs antagonistas de anti-TNF α . El grado de reducción de la señal de renilla producido por TNF α expresado endógenamente, permitirá la concentración del antagonista de TNF α en la muestra a cuantificar. El antagonista de TNF α puede ser retirado a continuación de la muestra por los medios adecuados. Por ejemplo, en el caso de Infliximab, que se compone únicamente de cadenas ligeras kappa, el medicamento puede ser retirado de la muestra a examinar para determinar la presencia de NABs anti-Infliximab utilizando una columna por afinidad con anti-kappa. De manera alternativa, los NABs anti-Infliximab pueden ser retirados de la muestra utilizando una columna por afinidad con proteínas G o proteínas A utilizando el método de ensayo de una fase según la presente invención.

[00117] La muestra que es analizada en el método según la presente invención es un fluido biológico de un sujeto mamífero, preferentemente un sujeto humano, en el que se espera que estén presentes el ligando extracelular o anticuerpos neutralizantes, como sangre. De manera más preferente la muestra es suero, saliva, lavado broncoalveolar o fluido cerebroespinal.

[00118] Una forma de realización preferente del método según la presente invención es cuando la célula utilizada en el ensayo es una célula tratada con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico congelado como se ha descrito arriba y que es descongelada a continuación, antes del uso, dentro de un periodo de tiempo en que la célula descongelada mantiene la actividad de transducción de señal específica de ligando.

[00119] Cuando el método según la presente invención se utiliza para determinar el nivel en una muestra de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo, la célula según la presente invención necesitaría tener cualquier producción endógena de ligando por la propia célula para que fuera insignificante o ausente. Dado que el ligando se expresa a partir de una segunda serie de uno o más elementos de control de

transcripción en el segundo constructo de ADN presente en la célula, la expresión del ligando en esta situación se controla a partir de una serie inducible de uno o más elementos de control de transcripción que es desactivada para que no interfiera en la determinación del nivel de ligando extracelular en la propia muestra.

[00120] Cuando el método según la presente invención se utiliza para determinar el nivel en una muestra de anticuerpos neutralizantes contra el ligando extracelular o contra un antagonista del ligando, el ligando puede ser expresado a partir de un promotor constitutivo o de una serie inducible de uno o más elementos de control de transcripción. Sin embargo, para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes contra un ligando antagonista (es decir, contra Enbrel, Infliximab, etc., para TNF α como el ligando extracelular), la célula según la presente invención incluye preferentemente un constructo adicional (es decir, tercer constructo de ADN) a partir del cual se expresan el antagonista del ligando y una tercera etiqueta mensurable diferente. De esta forma, la célula según la presente invención tendría todos los componentes necesarios de ligando, antagonista de ligando y expresión de respuesta a ligando de un gen indicador presente en una única célula para determinar anticuerpos neutralizantes en una muestra. Dicha célula solo requeriría la adición de una muestra no diluida para iniciar la valoración (y la presencia de sustrato del producto génico indicador).

[00121] Cuando el método de la presente invención está evaluando el nivel de un interferón de tipo I para determinar el título del interferón de tipo I o bien como ligando extracelular o anticuerpos neutralizantes para interferón tipo I, el primer producto génico indicador es preferentemente luciferasa de luciérnaga, aequorina de medusa o proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y está preferentemente bajo el control de un promotor quimérico sensible al interferón que contiene el ISRE de ISG15 y un promotor SV40 mínimo. Ejemplos de dichos constructos génicos indicadores se presentan en las Figuras 9 y 10. La Figura 9 es una representación esquemática de un constructo de gen indicador de luciferasa en un vector ISRE-luc (SEQ ID NO:7), donde el ISRE de ISG15 (SEQ ID NO: 2) está posicionado en nucleótidos 38-97 de SEQ ID NO:7, el promotor SV40 mínimo está posicionado en los nucleótidos 103-288 de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de codificación del gen indicador de luciferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 está posicionada en los nucleótidos 328-1980 de SEQ ID NO: 7. De manera similar, la Figura 10 es una representación esquemática de un constructo de gen EGFP en un vector ISRE-EGFP (SEQ ID NO:9), donde el ISRE de ISG15 está posicionado en los nucleótidos 30-89 de SEQ ID NO:9, el promotor SV40 mínimo está posicionado en los nucleótidos 95-290 de SEQ ID NO: 9, y la secuencia de codificación del gen indicador EGFP que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 está posicionada en los nucleótidos 358-1077 de SEQ ID NO: 9.

[00122] La muestra de suero (10 μ l) a valorar por si hay presencia de anticuerpos anti-ligandos se añade al pocillo de un placa de 96 pocillos que contiene 50.000 células "One Step" (células según la presente invención) en 50 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 2% BFS y una concentración adecuada de doxiciclina en la gama de 1.0 ng/ml a 10.0 μ g/ml, más preferentemente 1.0 μ g/ml. La muestra se incuba con las células a 37° C en una atmósfera de CO₂ en aire por un periodo de 4 a 18 horas, más preferentemente de 5 a 6 horas. Las actividades de la luciferasa de luciérnaga y luciferasa de renilla pueden ser determinadas secuencialmente después de añadir 50 μ l del reactivo de ensayo de luciferasa DUAL-GLOW (Promega, Madison, WI). Por lo tanto, la expresión de la luciferasa de luciérnaga puede ser cuantificada utilizando el reactivo de ensayo de luciferasa II (Promega, Madison, WI). Esta reacción es desactivada a continuación y se inicia la reacción de la luciferasa de renilla añadiendo 50 μ l del reactivo STOP & GLO (Promega, Madison WI) a la misma muestra y se cuantifica la expresión de luciferasa de renilla. El título neutralizante se determina a partir del nivel de expresión del gen de luciferasa de luciérnaga expresado en unidades de luminiscencia relativas (RLU) después de añadir el anticuerpo anti-ligandos (FL2) relativo al nivel de expresión en RLU de la luciferasa de renilla (RL2) dividido por el nivel de expresión del gen de luciferasa de luciérnaga sin añadir el anticuerpo anti-ligando (FL1) relativo al de la luciferasa de renilla (RL1). Por lo tanto, título neutralizante = FL2/RL2 dividido por FL1/RL1. Este título puede ser cuantificado a continuación con relación a una preparación de referencia NAb anti-ligando de título conocido. Una curva de titulación de anticuerpos neutralizantes anti-IFN α utilizando el presente método se presenta en la Fig. 11.

[00123] En la presente invención se describe un ensayo para la cuantificación de NABs anti-IFN alfa que supera muchas de las limitaciones de los ensayos convencionales de neutralización basados en células u otros ensayos con genes indicadores mencionados en la sección "Descripción de la técnica relacionada". El ensayo está basado en una célula que ha sido genéticamente manipulada para expresar y secretar IFN α 2 y para expresar el gen indicador de luciferasa de renilla transcrito a partir del mismo promotor inducible. La célula también contiene el gen indicador de luciferasa controlado por un promotor de respuesta a IFN quimérico. La expresión del gen indicador de renilla es estrictamente proporcional a la expresión de IFN α 2 y por lo tanto permite cuantificar la expresión IFN con precisión mientras que la expresión de luciferasa de luciérnaga permite cuantificar la actividad IFN. La presencia de NABs anti-IFN α en el entorno inmediato de la célula neutralizará una cantidad de IFN α secretado de la célula proporcional a la capacidad de neutralización del anticuerpo, e impedir así que el IFN interactúe con su receptor de superficie celular específico. Ello tendrá como resultado la correspondiente reducción de la actividad de IFN α , y por tanto la expresión del gen indicador de luciferasa de luciérnaga de respuesta a IFN, cuya actividad puede ser cuantificada. El grado de reducción de la expresión del gen indicador de respuesta a IFN α en presencia o ausencia de la muestra de NAB permitirá cuantificar el título neutralizante relativo de la muestra, relativo a un nivel dado de expresión del gen indicador de renilla transcrito del mismo promotor que IFN α .

[00124] El ensayo de una fase según la presente invención es aplicable a una amplia gama de biofarmacéuticos y permite la cuantificación de niveles residuales de medicamentos en una muestra de la expresión del gen indicador de respuesta a medicamentos antes de la inducción de la síntesis de medicamentos autocrinos. La síntesis de medicamentos es inducida a continuación y se cuantifica la actividad NAb en la misma muestra a partir del cambio de expresión del gen indicador de respuesta a medicamentos en presencia o ausencia de anticuerpos de medicamentos, sin necesidad de dilución seriada de la muestra, o adición de un medicamento exógeno. Aunque el ensayo NAb de una fase se basa en el mismo principio que un ensayo de neutralización de anticuerpos constante convencional, los resultados se normalizan con relación a la expresión de un estándar interno y son por lo tanto independientes del número de células que proporcionan un alto grado de precisión valorativa. El ensayo de una fase es por lo tanto ideal para análisis de alto rendimiento de Nabs anti-medicamentos.

[00125] En otro modo de realización de la invención, la línea celular utilizada como base del método de la presente invención, el llamado ensayo de neutralización de una fase NanoLite, fue derivada de la línea promonocítica humana U937 transfectada con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga controlado por un promotor quimérico de respuesta a interferón que contiene un promotor mínimo SV40 y el ISRE del gen ISG 15. La línea celular es también transfectada con un segundo constructo consistente en un vector que expresa el ligando de interés y un producto génico indicador de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor inducible como el promotor CMV Tet-On.

[00126] La actividad indicadora del ligando del gen indicador de luciferasa de renilla se determina en varios puntos de tiempo después de añadir un reactivo de luciferasa como EnduRen, o ViviRen (Promega, Madison, WI) que permite determinar la actividad de la luciferasa de renilla continuamente en células vivas. De manera alternativa, ejemplos no excluyentes de luciferasas que pueden ser utilizadas en lugar de luciferasa de renilla incluyen luciferasas como Luciferasa Gaussia o luciferasa Metridia junto con el adecuado sustrato de luciferasa. Por lo tanto, 10 µl de suero a valorar por si hay presencia de anticuerpos anti-ligandos se añaden al pocillo de una placa de 96 pocillos que contiene 50.000 células "One Step" (células según la presente invención) en 50 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 2% BFS y 1.0 µg/ml de doxiciclina y el sustrato de luciferasa adecuado. La muestra se incuba con las células a 37° C en el luminómetro por un periodo de 4 a 18 horas, más preferentemente de 5 a 6 horas y las lecturas de RLU se toman a intervalos regulares. El título neutralizante de la muestra se calcula a partir del tiempo tomado, T2, en presencia del anticuerpo anti-ligandos, para alcanzar un nivel correspondiente de expresión de luciferasa de renilla obtenido en un tiempo, T1, en ausencia de anticuerpos anti-ligandos.

[00127] Otro aspecto de la presente invención corresponde a un kit para determinar el nivel en una muestra de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de la célula. Este kit incluye un reactivo que contiene una pluralidad de células de la presente invención y o bien un dispositivo de prueba con una pluralidad de pocillos o un contenedor para almacenar el reactivo antes del uso. El dispositivo de prueba es preferentemente una placa de microtitulación multi-pocillos (por ej. una placa de microtitulación de 96 pocillos), pero también puede ser cualquier tipo de receptáculo como cápsulas de Petri o placas con una pluralidad de pocillos en los que se puede realizar el ensayo. El reactivo que contiene las células puede ponerse en los pocillos del dispositivo de prueba, aunque se comprenderá que dichas células pueden también ser colocadas en los pocillos del dispositivo de prueba por el usuario final antes de realizar el ensayo. El kit puede incluir también instrucciones de uso del kit en un ensayo. De manera preferente, el reactivo del kit se suministra congelado, y más preferentemente aún, las células congeladas según la presente invención tal como están contenidas en el reactivo han sido tratadas con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico, tal como se ha mencionado, antes de ser congeladas en un criopreservante.

[00128] Después de haber descrito la invención de manera general, se entenderá mejor mediante el siguiente ejemplo que se proporciona a modo de ilustración y no pretende limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplos

[00129] El ensayo único de una fase basado en células para determinar la actividad del interferón alfa (IFNα) ha sido desarrollado para permitir la cuantificación de la concentración de medicamento y anticuerpos neutralizantes anti-medicamento (NABs) en una única muestra de suero sin necesidad de dilución de muestra, adición de medicamento exógeno u otras manipulaciones. La actividad IFN se cuantifica con un alto grado de precisión y en pocas horas utilizando células transfectadas con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga controlado por un promotor quimérico de respuesta a IFN. Las células de ensayo también han sido manipuladas para expresar y secretar IFNα, cuya producción está normalizada con respecto a la expresión del gen indicador de luciferasa de renilla transcrito a partir de un promotor inducible de doxiciclina común. Por lo tanto, después de la cuantificación de niveles de IFN residuales en una muestra de suero de un paciente tratado con IFNα, se induce la síntesis de IFN autocrina y se puede cuantificar la actividad NAb instantáneamente a partir de la diferencia de expresión del gen indicador de respuesta a IFN, en presencia o ausencia de la muestra. Los resultados del ensayo se normalizan con relación a la expresión de un estándar interno que hace que los resultados sean independientes del número de células o de diferencias en viabilidad celular proporcionando por lo tanto un alto grado de precisión valorativa. Esta plataforma de ensayo única es muy adecuada para análisis de alto rendimiento de muestras y se aplica a la cuantificación tanto de la actividad como de los niveles NAb de una serie de biofarmacéuticos permitiendo la comparación de datos de inmunogenicidad entre ensayos y compuestos.

Materiales y Métodos

[00130] **Ensayo de gen indicador PIL5.** El oligonucleótido sintético bicatenario CTCGGGAAAGGGAAACCGAACTGAAGCC (SEQ ID NO:12), correspondiente al IRSE del gen ISG-15, que controla un promotor mínimo SV40 fue clonado corriente arriba del gen indicador de luciferasa por inserción en el sitio Xho/BglII del vector del promotor pGL2 (Promega, Madison, WI) tal como se describió anteriormente (Lallemant et al., 2008). Células U937 promonocíticas humanas fueron transfectadas con constructo de gen indicador regulado IFN y transfectantes estables fueron aislados y clonados. Se estableció así la línea celular humana, PIL5, que comportaba el gen indicador de luciferasa bajo el control de un promotor quimérico de respuesta a IFN. Se obtuvieron células PIL5 con división detenida, tratadas con vinblastina listas para ser valoradas (Ensayo iLite Alfa-Beta) de Biomonitor Ltd, Galway, Irlanda, y se almacenaron a -80°C hasta su uso, según instrucciones del fabricante. En resumen, las células congeladas fueron rápidamente descongeladas e incubadas durante la noche en una placa de micro-titulación de 96 pocillos (50.000 células/pocillo), por duplicado con diluciones seriadas de IFN en un volumen total de 100 µl/pocillo. Las células fueron lisadas a continuación mediante la adición de 100 µl/pocillo del reactivo conteniendo sustrato de luciferasa y se determinó la actividad de la luciferasa en un luminómetro (LumiCount™, Packard Instruments Inc, Downers, Grove IL). Se determinó la actividad del interferón a partir de la curva de respuesta a dosis de las unidades de luminiscencia correspondientes (RLU) contra diluciones de la preparación de referencia IFN internacional adecuado utilizando software Excel™. Los resultados se expresan en IU/ml.

[00131] **Construcción del Vector pTRE/IFNα2/hRL.** El vector TRE/IFNα2/hRL fue construido como sigue: La región codificadora del gen IFNα2 humano fue amplificada por PCR de un extracto genómico humano utilizando los siguientes cebadores (primers) que contienen sitios de restricción EcoRI y BamHI respectivamente en sus extremidades 5':

Sentido IFNα2: 5' ACGTGAATTCGCAACATCTACAATGGCCTTGACCTTT3' (SEQ ID NO: 13)

Antisentido IFNα2: 5' GATCGGATCCAGTTTTCATTCCTTACTTCTTAAAC 3' (SEQ ID NO: 14)

La versión humanizada del gen de luciferasa de Renilla (hRenilla) fue amplificada por PCR a partir del vector psiCHEK-2 (Promega, Ref. Catálogo C8011) utilizando los siguientes cebadores que contenían sitios de restricción SmaI y XbaI respectivamente en sus extremidades 5':

Sentido hRenilla: 5' TCGTCCCGGGATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCC 3' (SEQ ID NO: 15)

Antisentido hRenilla: CTAGTCTAGATTACTGCTCGTTCTTCAGCACG 3' (SEQ ID NO: 16)

Los productos de amplificación hRenilla y IFNα2 fueron clonados en los sitios EcoRI/BamHI y SmaI/XbaI respectivamente del plásmido pIRES2Neo (Clontech, Palo Alto, CA, Ref. Catálogo 6938-1). El fragmento de restricción EcoRI/XbaI de este constructo, conteniendo la región codificadora del gen humano IFNα2, el IRES y el gen hRenilla, fueron clonados en los sitios de restricción EcoRI/XbaI del vector pTRE-Tight (Clontech, ref. catálogo 631059). La integridad de cada constructo se comprobó por secuenciación.

[00132] **Suero de pacientes.** Sueros de pacientes tratados con IFN recombinante alfa o IFN beta y monitorizados para detectar presencia de anticuerpos anti-IFN neutralizantes fueron seleccionados aleatoriamente para su evaluación en el presente estudio.

[00133] **IFNα2a Recombinante** (Roferon-A™) fue adquirido en Hoffmann-La Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia. La preparación utilizada en este estudio tuvo un título de 9.0 x 10⁶ IU/ml en células HuH7 humanas provocadas con virus de estomatitis vesicular (VSV). La preparación fue normalizada según la preparación de referencia internacional IFNα humano (G023-901-527). La actividad específica de la preparación de interferón fue 2 x 10⁸ IU/mg de proteínas.

[00134] **IFNα2b Recombinante** (Intron-A™) fue adquirido en Schering-Plough, Levallois-Perret, Francia. La preparación utilizada en este estudio tuvo un título de 1.0 x 10⁷ IU/ml en células HuH7 humanas provocadas con VSV. La preparación fue normalizada según la preparación de referencia internacional IFNα humano (G023-901-527). La actividad específica de la preparación de interferón fue 2 x 10⁸ IU/mg de proteínas.

[00135] **Bioensayo IFN.** La actividad IFN fue determinada por la inhibición del efecto citopático (CPE) del VSV sobre células HuH7 humanas tal como se ha descrito anteriormente (Lallemant et al., 2008).

[00136] **Ensayos de neutralización.** En resumen, diluciones seriadas de suero humano fueron incubadas por duplicado durante 1 hora a 37°C seguido de 2 horas a 4°C con una cantidad constante (10 LU/ml) de una preparación IFN particular diluida en medio RPMI 1640 + 2% de suero fetal bovino (FBS) en una placa de microtitulación de 96 pocillos (método IFN constante), o una dilución constante de suero fue incubada en las mismas condiciones con diluciones seriadas de IFN (método de anticuerpos constantes). Luego se determinó la actividad

IFN residual utilizando o bien el bioensayo de efecto citopático viral (CPE) o el ensayo de gen indicador PIL5. El preparado de IFN utilizado en cada test de neutralización fue también valorado simultáneamente para determinar su actividad IFN precisa en el ensayo de ese día. La dilución más baja de suero sometido a prueba fue también valorada sola para determinar la presencia de toxicidad o actividad IFN.

[00137] Se determinó el título neutralizante utilizando la metodología Kawade (Grossberg et al., 2001a y 2001b) que determina el recíproco de la dilución de anticuerpos que reduce la actividad IFN de 10 a 1.0 LU/ml según la fórmula: $t = f(n-1)/9$, donde f = el recíproco de la dilución de anticuerpos y n = concentración de IFN en LU/ml (Grossberg et al., 2001b; y Lallemand et al. 2008). Por lo tanto, cuando $n = 10$ LU/ml, $t = f$. Los títulos neutralizantes se expresan como Unidades de Reducción en Décuplo, o TRU/ml (Grossberg et al., 2001a y 2001b). Los títulos de neutralización fueron corregidos en el número real de LU/ml de IFN utilizados en el ensayo de neutralización a partir del valor obtenido en la valoración simultánea de IFN.

[00138] **Ensayo de neutralización de una fase.** PIL5C2.2 fueron incubadas durante la noche en una placa de micro-titulación de 96 pocillos (37.500 células/pocillo), por duplicado con una dilución simple en un volumen total de 75 µl/pocillo y 25 ng/ml de Doxiciclina (Clontech Ref. Catálogo 631311). Las actividades de la luciferasa de renilla y de luciérnaga fueron determinadas secuencialmente en el mismo pocillo utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega, Ref. Catálogo E2940) según instrucciones del fabricante. Las células fueron lisadas en primer lugar mediante la adición de 100 µl/pocillo del reactivo conteniendo sustrato de luciferasa de luciérnaga y se determinó la actividad de la luciferasa de luciérnaga en un luminómetro (LumiCount™, Packard Instruments Inc, Downers Grove IL). La actividad de luciferasa de renilla fue determinada a continuación después de añadir en el mismo pocillo 50 µl de sustrato de luciferasa de renilla. La actividad neutralizante de la muestra NAb fue determinada a continuación a partir del ratio de la actividad de luciferasa de luciérnaga en presencia de la muestra conteniendo NAb (FL2) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla (RL2) y la actividad de luciferasa de luciérnaga de la muestra de control (FL1) normalizada con respecto a la expresión de luciferasa de renilla de la muestra de control (RL1): (FL2/RL2)/(FL1/RL1).

Resultados

Establecimiento de la línea celular de gen indicador de respuesta a IFN secretando IFN

[00139] La línea celular promonocítica humana U937 fue transfectada con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga controlado por un promotor quimérico de respuesta a interferón que contiene un promotor mínimo SV40 y el ISRE del gen ISG 15 tal como se ha descrito previamente (Lallemand et al., 2008). Estas células fueron a continuación co-transfectadas en primer lugar con el vector pTRE/IRES/IFNA2/hRL 5.000 bp (SEQ ID NO:17) comprendiendo la secuencia codificadora del gen IFNalfa2a humano incluyendo su péptido de señal natural (nucleótidos 323-913), el sitio interno de entrada al ribosoma (IRSE) del citomegalovirus (CMV), nucleótidos 914-1,859, junto con la secuencia codificadora de la luciferasa de renilla (nucleótidos 1,860-2,801), bajo el control de un elemento compuesto de respuesta a Tet (TRE)-promotor CMV (nucleótidos 1-323). Esta construcción permite que la transcripción de ARN primario sea trasladada a dos proteínas nativas distintas (IFNalfa2a y luciferasa de Renilla) para conservar la estructura terciaria de la proteína IFNalfa2a humana y por lo tanto, su reconocimiento por anticuerpos anti-IFNalfa. En segundo lugar, con un vector que codifica la proteína de transactivación inversa controlada por Tet que confiere la expresión génica inducida por tetraciclina/doxiciclina (Tet), como se indica en la Fig. 14.

[00140] El gen indicador de luciferasa de renilla y el gen IFNalfa2a humano fueron expresados bajo el control de un promotor CMV inducible por doxiciclina (Tet-On) a fin de impedir que la expresión continuada de IFNs tipo I humanos inhibiera la proliferación celular y por lo tanto impidiera el cultivo de la línea celular transfectada.

[00141] Se aislaron clones estables y se sometieron a prueba para evaluar la inducibilidad estricta de la expresión IFN y la respuesta a IFN, después de inducción con doxiciclina. A continuación se caracterizó más el clon C2.2 (PIL5C2.2).

[00142] El tratamiento de células PILC2.2 con concentraciones crecientes de doxiciclina (0.1 a 100 ng/ml) tuvo como resultado un aumento dependiente de la dosis en la expresión de luciferasa de renilla (Figura 15A). El aumento de expresión de luciferasa de renilla fue acompañado por el correspondiente aumento de la expresión de IFNalfa2a como lo demuestra el aumento de producción de IFNalfa2a en el sobrenadante del cultivo (datos no mostrados). El aumento de expresión de IFNalfa2a estuvo también acompañado del correspondiente aumento de la expresión de luciferasa de luciérnaga de respuesta a IFN (FL) (Figura 15A). La adición de una concentración constante de un anticuerpo neutralizante anti-IFNalfa policlonal tuvo como resultado una reducción marcada en la expresión de luciferasa de luciérnaga (Luc designado por barras blancas en Figs. 15A-15B), con relación al valor observado en presencia de una dilución equivalente de suero de control, sin afectar a la expresión de luciferasa de renilla de manera importante en una amplia gama de concentraciones de doxiciclina (Figura 15B).

[00143] La razón de expresión de la luciferasa de luciérnaga (abreviado como "FL") con la expresión de luciferasa de renilla (abreviado como "RL") en ausencia de anticuerpos con respecto a la presencia de anticuerpos anti-IFNalfa

(FL1/RL1)/(FL2/RL2) permaneció relativamente constante en concentraciones de doxicilina de 0,1 a 10 ng/ml aunque la expresión de IFNalfa2 aumentó 8 veces (Figura 16A). La razón (FL1/RL1)/(FL2/RL2) también permaneció relativamente constante en diluciones 1:10 o 1:100 de suero individual de pacientes con hepatitis C crónica tratados con IFNalfa2a o IFNalfa2b y conteniendo anticuerpos anti-IFNalfa neutralizantes (Figura 16B).

[00144] Se descubrió que la expresión de luciferasa de luciérnaga sigue una curva de respuesta a dosis sigmoide típica característica de una curva de respuesta a dosis de IFN clásica después del tratamiento de células PILC2.3 con concentraciones crecientes de doxicilina (Figura 17). En cambio, la expresión de luciferasa de renilla no se saturó en las concentraciones de doxicilina sometidas a prueba (Figura 17).

[00145] El tratamiento de células PILC2.2 con diferentes concentraciones de doxicilina (25 o 250 ng/ml) no cambió de manera significativa la actividad neutralizante anti-IFNalfa del suero humano sometido a prueba. Por lo tanto se cuantificó una serie de sueros de pacientes con hepatitis C crónica conteniendo diversas actividades neutralizantes anti-IFNalfa utilizando el ensayo de una fase después del tratamiento con 25 o 250 ng/ml de doxicilina (Figura 18).

[00146] Se utilizaron dos enfoques principales para cuantificar NABs anti-IFN: el método de IFN constantes y el método de anticuerpos constantes. En el primero, una cantidad constante de IFN se mezcla con diluciones crecientes de suero mientras que en el segundo una dilución fija de suero se mezcla con concentraciones variables de IFN. Aunque ambos métodos dan resultados similares (Figuras 19A y 19B) el método de anticuerpos constantes ha demostrado ser el más sensible de los dos enfoques y capaz de detectar sueros débilmente neutralizantes no detectados por el método de IFN constantes (Lam et al., 2008). Como el ensayo NAB de una fase se basa en el mismo principio que el método de anticuerpos constantes, se sometió a prueba el suero de pacientes con hepatitis C crónica tratados con IFNalfa2a o IFNalfa2b para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra IFNalfa utilizando el método de anticuerpos constantes y un ensayo de inhibición citopática (CPE) o ensayo de gen indicador de luciferasa para cuantificar la actividad IFNalfa. De acuerdo con un informe anterior (Lallemant et al., 2008), se obtuvieron resultados similares para los títulos neutralizantes, expresados como TRU/ml, para sueros individuales utilizando un ensayo NAB IFN constante, cuando se sometieron a prueba utilizando el ensayo CPE o el de gen indicador de luciferasa para medir la actividad IFN ($R^2 = 0,85$, Figura 20A). Los resultados fueron comparados a continuación con los obtenidos utilizando el método de una fase. Como era de esperar se observó un grado algo menor de correlación ($R^2 = 0,63$) entre los resultados obtenidos utilizando el ensayo CPE para cuantificar niveles de NAB anti-IFNalfa utilizando el método IFN constante y los obtenidos utilizando un ensayo de una fase (equivalente al método de anticuerpos constantes) para cuantificar el título neutralizante en TRU/ml de las mismas muestras (Figura 20B). En cambio se observó un alto grado de correlación ($R^2 = 0,85$) para los títulos neutralizantes anti-IFNalfa de suero humano individual, expresados como TRU/ml, utilizando el ensayo NAB IFN constante y el ensayo de gen indicador de luciferasa para medir la actividad IFN en comparación con los resultados obtenidos para los mismos sueros utilizando el método de una fase (Figura 20C).

[00147] Aunque el ensayo NAB de una fase se basa en el mismo principio que un ensayo de neutralización de anticuerpos constantes convencional, los resultados se normalizan con relación a la expresión de un estándar interno y por lo tanto no se ven influidos por variaciones en el número de células o errores en la dilución de la muestra.

[00148] Después de haber descrito por completo esta invención, los expertos en la técnica comprenderán que la misma puede realizarse dentro de una amplia gama de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin desviarse del espíritu y alcance de la invención y sin experimentación indebida.

[00149] Aunque esta invención ha sido descrita en relación con modos de realización específicos, se entiende que se pueden introducir modificaciones. Esta solicitud pretende cubrir variaciones, usos o adaptaciones de las invenciones siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo desviaciones de la presente descripción provenientes de la práctica habitual o conocida dentro del sector al que pertenece la invención y que puedan aplicarse a las características esenciales aquí indicadas como se desprende del alcance de las reivindicaciones que se adjuntan.

[00151] La referencia a fases de métodos conocidos, fases de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no constituye en modo alguno una aceptación de que cualquier aspecto, descripción o modo de realización de la presente invención se revelen, enseñen o recomienden en el arte relevante.

[00152] La descripción anterior de los modos de realización específicos revela la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando los conocimientos del sector (incluyendo el contenido de las referencias citadas aquí), modificar y/o adaptar para diversas aplicaciones dichos modos de realización específicos, sin experimentación indebida, sin desviarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones tienen la finalidad de entrar dentro del significado y alcance de formas equivalentes de los modos de realización mencionados, en base a las enseñanzas y orientaciones aquí presentadas. Se entiende que la fraseología o terminología empleada es a efectos de describir y no de limitar, de manera que la terminología y fraseología de la presente especificación debe ser interpretada por el técnico experto a la luz de las enseñanzas y orientaciones aquí presentadas, en combinación con los conocimientos del experto en la materia.

REFERENCIAS

Abramovich et al. (1994) Fosforización diferencial de la tirosina de la cadena IFNAR del receptor de interferón de tipo I y de una proteína asociada superficial en respuesta a IFN- α y IFN- β . *Embo J.* 13:5871.

Alton et al. (1979) Análisis de secuencias nucleotídicas del transposon de resistencia al cloranfenicol Tn9. *Nature* 282:864-869

Ank et al *JICR* 2006, 26:373-379

Antonetti F, Finocchiaro O, Mascia M, Terlizze MG, Jaber A. J. *Interferon & Cytokine Res.* (2002) 22:1181-1184.

Baldwin et al. (1984) Clonación de genes estructurales de la luciferasa a partir de *Vibrio harveyi* y expresión de bioluminiscencia en *Escherichia coli*. *Biochemistry* 23:3663-3667

Barbieri et al. (1994) Activación de la proteína tirosina quinasa tyk2 por interferón α/β . *Eur J Biochem.* 223:427.

Basu et al. (1998) La acción antiviral del interferón se potencia por la eliminación del dominio IRTAM conservado de la cadena IFNAR1 del receptor del interferón α/β : efectos sobre la activación JAK-STAT y regulación negativa del receptor. *Virology.* 242:14.

Bazan, (1990). Diseño estructural y evolución molecular de una superfamilia de receptores de citoquinas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6934.

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) El factor de crecimiento de fibroblastos básico entra en el nucleolo y estimula la transcripción de genes ribosomales en células ABAE experimentando transición GO $\rightarrow$ G1. *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 84:6770-6774

Boulter et al. (1986) Aislamiento de un clón ADNc que codifica para una posible subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina neural. *Nature* 319:368-374

Boulter et al. (1990) Alfa 3, α 5 y β 4: tres miembros de la familia de genes relacionados con el receptor nicotínico de acetilcolina neuronal de rata forman un agrupamiento de genes. *J. Biol. Chem.* 265:4472-4482

Branca et al. (1981) Evidencia de que los interferones de tipos I y II tienen diferentes receptores. *Nature.* 294:768.

Bunzow et al. (1988) Clonación y expresión de ADNc del receptor de dopamina D2 de rata. *Nature* 336:783-787

Canosi et al. (1996) Bioensayo de gen reportero altamente preciso para interferón de tipo I. *Journal of Immunological Methods* 199:69-76

Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, y Mayeux P. Aplasia pura de células rojas y anticuerpos anti eritropoyetina en pacientes tratados con eritropoyetina recombinante. *N Engl J Med* 346: 469-475, 2002.

Changelian et al. (1989) Estructura del gen NGFI-A y detección de secuencias aguas arriba responsables de su inducción transcripcional por factor de crecimiento nervioso. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:377-381

Changelian et al. (1989) Estructura del gen NGFI-A y detección de secuencias aguas arriba responsables de su inducción transcripcional por factor de crecimiento nervioso. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:377-381

Cleary et al. (1994) Desactivación y reconstitución de un complejo receptor del interferón de tipo I humano funcional. *Journal of Biological Chemistry.* 269:18747.

Clerico M, Contessa G. Durelli L. Interferón- β 1a para el tratamiento de la esclerosis múltiple. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2007) 7:535-542.

Cohen et al. (1995) Asociación inducida por ligando de componentes del receptor del interferón de tipo I. *Mol Cell Biol.* 15:4208.

Colamonici et al. (1994) Fijación directa y fosforilación de la tirosina de la subunidad α del receptor del interferón de tipo I por tirosina quinasa p135tyk2. *Mol. Cell. Biol.* 14:8133.

Comb et al. (1986) *Nature* 323:353-356

Constantinescu et al. (1994) Rol de la cadena 1 del receptor de interferón alfa/beta en la estructura y membrana que señalan el complejo receptor alfa/beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:9602.

5 Constantinescu et al. (1995) Expresión y especificidad de señalización de la cadena IFNAR del complejo receptor del interferón de tipo I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10487.

Cook et al. (1996) Grado de respuesta diferencial de una variante alternativa de corte y empalme de receptor del interferón de tipo I a interferones. *J Biol Chem*. 271:13448.

10 Cutrone et al. (1997) Contribuciones de subunidades de receptores del interferón de tipo I clonado a la fijación diferencial de ligandos. *FEBS Lett*. 404:197.

15 Darnell et al. (1994) Vías Jak-STAT y activación transcripcional en respuesta a IFNs y otras proteínas de señalización extracelular. *Science*. 264:1415.

De Maeyer et al. (1988) Interferones y otras citocinas reguladoras. John Wiley, Nueva York: 69.

20 Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A., Medición de anticuerpos neutralizantes de interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple, *J. Neurol.* (2004) 251 (Supl. 2):11:31-11:39.

Deneris et al. (1988) Estructura primaria y expresión de beta 2: una subunidad novedosa de receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales. *Neuron* 1:45-54

25 Deneris et al. (1989) Beta 3: un nuevo miembro de la familia del gen receptor nicotínico de acetilcolina se expresa en el cerebro. *J. Biol. Chem*. 264: 6268-6272

deWet et al. (1987) Gen de luciferasa de luciérnaga: estructura y expresión en células de mamíferos. *Mol. Cell Biol*. 7:725-737

30 Diaz et al. (1993) Nomenclatura de los genes de interferón humano. *J Interferon Res*. 13:443

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis E., Sousa C. (2003). Respuestas antivirales innatas por medio del reconocimiento mediado por TLR7 de ARN monocatenario. *Science*. 303, 1529-1531.

35 Dixon et al. (1986) Clonación del gen y ADNc para receptor beta-adrenérgico de mamífero y homología con rodopsina. *Nature* 321:75-79

40 Domanski et al. (1995) Clonación y expresión de una forma larga de la subunidad beta del receptor de interferón alfa-beta que se requiere para señalización. *J Biol Chem*. 270:21606.

Domanski et al. (1996) Receptor de interferón de tipo I. El corto y el largo. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7:143.

45 Duvoisin et al. (1989) La diversidad funcional de los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales se incrementa con una subunidad novedosa: beta 4. *Neuron* 3:487-496

Ellis et al. (1988) Secuencia y expresión de ARNm que codifica las subunidades alfa 1 y alfa 2 de un canal de calcio sensible a DHP. *Science* 241:1661-1664

50 Engebrecht et al. (1984) Identificación de genes y productos génicos necesarios para la bioluminiscencia bacteriana. *PNAS* 1:4154-4158

Fiette et al. (1995) Infección del virus de Theiler de ratones 129Sv que carecen de receptores de interferón alfa/beta o interferón gamma. *Journal of Experimental Medicine*. 181:2069.

55 Fink et al. (1988), El motivo de secuencia CGTCA es esencial para la actividad biológica del potenciador regulado por AMPc génico del péptido intestinal vasoactivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85:6662-6666

60 Frielle et al. (1987) Clonación del ADNc para el receptor 1-adrenérgico beta humano. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84:7920-7924

Fu, (1992) Un factor de transcripción con dominios SH2 y SH3 es directamente activado por una proteína citoplasmática tirosina quinasa inducida por interferón alfa. *Cell*. 70:323.

65 Giovannoni G. Optimizar terapias que modifican la esclerosis múltiple: anticuerpos en perspectiva. *J. Neurol.* (2004) 251 (Supl. 5) v30-v35.

Goldman et al. (1987) Miembros de una familia del gen receptor nicotínico de acetilcolina se expresan en diferentes regiones del sistema nervioso central mamífero. *Cell* 48:965-973

5 Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M, y Klein JP. La neutralización de interferones por anticuerpos. II. Cantidad en unidades de anticuerpos neutralizantes y su relación con la sensibilidad del bioensayo: unidad de reducción multiplicada por diez. *J Interferon Cytokine Res* 21: 743-755, 2001a.

10 Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M, Yokoyama H, y Finter N. La neutralización de interferones por anticuerpos. I. Análisis teórico y cuantitativo de la reacción de neutralización en diferentes sistemas de bioensayos. *J Interferon Cytokine Res* 21: 729-742, 2001b.

Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101

15 Hammerling et al. (1998) El ensayo con interferón Beta-gal: un método nuevo, preciso y sensible. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18:451-460

20 Hartung HP, Polman, 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. Anticuerpos neutralizantes para interferón beta: Informe del panel de expertos. *J. Neurol* (2007 abril 24) (Adelanto en versión digital)

25 Hollmann et al. (1989) Clonación por expresión funcional de un miembro de la familia del receptor de glutamato. *Nature* 342:643-648

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). Un receptor de tipo Toll reconoce ADN bacteriano. *Nature* 408, 740-745.

30 Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Santon H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K, y Akira, S. (2004). Los roles de dos quinasas IKB en la infección viral y señalización de ARN bicatenario y lipopolisacáridos. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650.

35 Horvath et al. (1995) Un dominio de proteína STAT que determina el reconocimiento de secuencia de ADN sugiere un dominio de fijación a ADN novedoso *Genes Dev.* 9:984-994

Hwang et al. (1995) Una mutación anuladora en el gen que codifica un componente de receptor del interferón I elimina la respuesta antiproliferativa y antiviral a interferones alfa y beta y altera respuestas macrófagas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:11284.

40 Ihle,(1995) Señalización de receptor de citocinas. *Nature.* 377:591.

Jay et al. (1990) Estructura primaria de la subunidad gamma del canal de calcio sensible a DHP de músculo esquelético. *Science* 248:490-492

45 Johnson et al. (1986) *Cell* 47:545-554

Julius et al. (1988) Caracterización molecular de un ADNc funcional que codifica el receptor 1c de serotonina. *Science* 241:558-564

50 Julius et al. (1990) El receptor 5HT2 define una familia de receptores de serotonina estructuralmente distintos pero funcionalmente conservados. *PNAS* 87:928-932

55 Kayano et al, (1988) Estructura primaria de un canal III de sodio de cerebro de rata deducido de la secuencia de ADNc. *FEBS Lett.* 228:187-194

Kobilka et al. (1987) Un gen sin intrones que codifica un miembro potencial de la familia de receptores acoplados a proteínas reguladoras de nucleótidos de guanina. *Nature* 329:75-79

60 Kobilka et al. (1987) Clonación, secuencia y expresión del gen que codifica al receptor alfa 2-adrenérgico en plaquetas humanas. *Science* 238:650-656

Lallemant C, Lebon P, Rizza P, Blanchard B, Tovey MG. Expresión constitutiva de isotipos de interferones específicos en leucocitos periféricos de individuos normales y en células U937 promonocíticas. *J. Leuk.Biol.* (1996) 60:137-146.

65 Lallemant C, Meritet JF, Erickson R, Grossberg SE, Rouillet E, Lyon-Caen O, Lebon P, y Tovey MG. Cuantificación

de anticuerpos neutralizantes para interferones de tipo I humanos utilizando células congeladas de división estancada portadoras de gen reportero regulado por interferón. *J Interferon Cytokine Res* 28: 393-404, 2008.

Lam R, Farrell R, Aziz T, Gibbs E, Giovannoni G, Grossberg S, y Oger J. Parámetros de validación de un ensayo con gen reportero de luciferasa para medir anticuerpos neutralizantes para IFNβ en pacientes con esclerosis múltiple. *J Immunol Methods* 336: 113-118, 2008.

Langer et al. (1996) Receptores para interferones *Biotherapy* 8:163

Levitan et al. (1988) Base estructural y funcional para la heterogeneidad del receptor GABAA. *Nature* 335:76-79

Levy et al. (1988) Factores nucleares inducidos por interferón que fijan una correlación del elemento promotor compartido con control positivo y negativo *Genes Dev.* 2:383-393

Lewis, (1995) Un ensayo biológico sensible para interferones. *Journal of Immunological Methods* 185:9-17

Lim et al. (1993) Clonación y caracterización de un receptor de interferón alfa bovino. *Biochim Biophys Acta.* 1173:314.

Lleonart et al., (1990) Un bioensayo novedoso y cuantitativo para interferón de tipo I utilizando una línea de células indicadoras recombinantes. *Biotechnology* 8:1263-1267

Lutfalla et al. (1992) La estructura del gen receptor del interferón alfa/beta humano. *J Biol Chem.* 267:2802.

Lutfalla et al. (1995) Células U5A mutantes son complementadas por una subunidad del receptor de interferón alfa-beta generada por el procesado alternativo de un nuevo miembro de un agrupamiento de genes receptores de citocinas. *Embo J.* 14:5100.

McCormick PL, Scott LJ. Interferón-beta 1b: revisión de su uso en esclerosis múltiple secundaria progresiva y recurrente remitente. *CNR Drugs*, (2004)18:521-546.

McKinnon, D. (1989) Aislamiento de un clón de ADNc que codifica para un segundo canal putativo de potasio indica la existencia de una familia de genes. *J. Biol. Chem.* 264:8230-8236

Meager, A. (2006) Medición de citocinas por bioensayos: Teoría y aplicación, *Métodos* 28:237-252.

Merlin et al. (1985) Interferones alfa, beta y gama humanos etiquetados 125I: datos comparativos de fijación al receptor. *J Gen Virol.* 66:1149.

Montminy et al. (1986), Identificación de un elemento de respuesta a AMP cíclico en el gen de somatostatina de rata. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6682-6686

Mouchel-Vielh et al. (1992). Actividades antivirales específicas de los interferones alfa humanos determinadas a nivel de la estructura del receptor (IFNAR). *FEBS Lett.* 313:255.

Muller et al. (1994) Rol funcional de interferones de tipo I y tipo II en defensa antiviral. *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

Neumann TA y Foote M. Crecimiento de megacariocitos y factor de desarrollo (MGDF): un ligando Mpl y citocina que regula la trombopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 6: 47-56, 2000.

Noda et al. (1986) *Nature* 320:188-192

Noronha A. Anticuerpos neutralizantes para interferón. *Neurology*, (2007) 68(24 Suppl 4): 516-22.

Novick et al. (1994) El receptor de interferón alfa/beta humano: caracterización y clonación molecular. *Cell.* 77:391.

Perry et al., (1999) Clonación del gen 17 estimulado por interferón: Las proteínas promotoras y nucleares que regulan la transcripción. *Molecular Endocrinology*, 13:1197-1206

Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W.C., y Cheng, G. (2004). Requisito diferencial para quinasa 1 que se fija a TANK en repuestas a interferón tipo I

Pestka et al. (1987) Interferones y sus acciones. *A. Rev. Biochem.* 56:727.

Platanias et al. (1994) Fosforilación de tirosina de las subunidades alfa y beta del receptor de interferón de tipo I. Interferón beta induce selectivamente la fosforilación de tirosina de una proteína asociada a subunidad alfa. *J. Biol. Chem.* 269:17761.

Pritchett et al. (1989) Importancia de una subunidad del receptor GABAA novedosa para farmacología de benzodiazepina. *Nature* 338:582-585

Rider et al. (2003) Un sensor basado en células B para la identificación rápida de patógenos. *Science* 301:213-215

Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, Lublin FD, Weinstock-Guttman 2, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. *N. Engl. J. Med.* (2006) 354:911-923.

Russell-Harde et al. (1995) Reconstitución de un sitio de fijación de alta afinidad para interferones de tipo I. *J Biol Chem.* 270:26033.

Ruth et al. (1989) Estructura primaria de la subunidad beta del canal de calcio sensible a DHP de músculo esquelético. *Science* 245:1115-1118

Schindler et al. (1992) Fosforilación de tirosina dependiente de interferón de un factor de transcripción citoplasmático latente [ver comentarios]. *Science.* 257:809.

Schellekens H. Cómo predecir y prevenir la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas. *Biotechnol Annu Rev* 14: 191-202, 2008.

Schofield et al. (1987) Secuencia y expresión funcional del receptor GABA A muestra una super-familia de receptores regulados por ligandos. *Nature* 328:221-227

Schumacher et al. (1994) El promotor Mx del pollo contiene un motivo ISRE y confiere inducibilidad por interferones para un gen reportero en células de pollo y mono. *Virology* 15:203(1):144-8

Sheng et al. (1990) La regulación y función de c-fos y otros genes tempranos inmediatos en el sistema nervioso. *Neuron* 4:477-485

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

Steinhoff et al. (1995) Protección antiviral por anticuerpos específicos de virus de estomatitis vesicular en ratones deficientes en receptores de interferones alfa/beta. *Journal of Virology.* 69:2153

Steinman, R.M., y Hemmi, H. (2006). Células dendríticas: convirtiendo la inmunidad innata en adaptativa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 17-58.

Stormann et al. (1990) Clonación molecular y expresión de un receptor D2 de dopamina de retina humana. *Molec. Pharm.* 37:1-6

Tanabe et al. (1987) Estructura primaria del receptor de bloqueadores del canal de calcio de músculo esquelético. *Nature* 328:313-E318

Taniguchi, (1995) Señalización de citocina a través de proteínas tirosina quinasas no receptoras. *Science.* 268:251.

Tempel et al. (1988) Clonación de un probable gen del canal de potasio de cerebro de ratón. *Nature* 332:837-839

Thoreau et al. (1991) Simetría estructural del dominio extracelular de la familia del receptor de prolactina/hormona del crecimiento/citocina y receptores de interferón revelada por análisis de agrupamiento hidrofóbico. *FEBS Lett.* 282:26.

Toh et al. (1989) Aislamiento y caracterización de un gen de la fosfatasa alcalina de hígado de rata. Un único gen con dos promotores. *Eur. J. Biochem.* 182:231-238

Uddin et al. (1995) Interacción del activador transcripcional Stat-2 con el receptor de interferón de tipo I. *J Biol Chem.* 270:24627.

Uematsu, S., y Akira, S. (2007). Receptores de tipo Toll e interferones de tipo I. *J. Biol. Chem.* 282, 15319-15323.

Uze et al. (1990) Transferencia genética de un receptor de interferón alfa humano funcional en células de ratón: clonación y expresión de su ADNc. *Cell.* 60:225.

Uze et al. (1992) Comportamiento de un receptor de interferón alfa/beta de roedor clonado en entorno homoespecífico o heteroespecífico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4774.

Uzé et al. (1995) Interferones alfa y beta y sus receptores y relaciones. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 15:3.

van den Broek et al. (1995) Defensa antiviral en ratones que carecen de receptores de interferones alfa, beta y gama. *Journal of Virology.* 69:4792.

Vandenbroek et al. (1995) Defensa inmune en ratones que carecen de receptores de interferón de tipo I y/o de tipo II. *Immunol Rev.* 148:5.

Velázquez et al. (1995) Dominios distintos de la proteína tirosina quinasa Tyk2 requeridos para la fijación del interferón alfa/beta y para la transducción de señal. *J Biol Chem.* 270:3327.

Wada et al. (1988) Expresión funcional de un nuevo subtipo farmacológico de receptor nicotínico de acetilcolina del cerebro. *Science* 240:330-334

Yan et al. (1996) Caracterización molecular de un dominio de subunidad de receptor 1 de interferón alfa (IFNaR1) requerido para la fijación TYK2 y transducción de señal. *Mol Cell Biol.* 16:2074.

Yan et al. (1996) La subunidad de receptor 1 de interferón alfa fosforilado (IFNaR1) actúa como un sitio de acoplamiento para la forma latente de la proteína STAT2 113 kDa. *Embo J.* 15:1064.

Yeh et al. (1987) Localización ultraestructural de proteínas relacionadas con v-sis/factor de crecimiento derivado de plaquetas en citoplasma y núcleo de células transformadas por virus de sarcoma de simio. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:2317-232

Ymer et al. (1989) Heterogeneidad de subunidad de receptor beta GABAA: expresión funcional de ADNs clonados. *Embo J.* 8:1665-1670

Yoneyama, M., Fujita, T. (2007). Función de receptores de tipo RIG-I en inmunidad antiviral innata. *J. Biol. Chem.* 282, 15315-15318.

Zlokarnik et al. (1998) Cuantificación de transcripción y selección clonal de células vivas de uso único con β -lactamasas como reporteras. *Science* 279:84-88.

REIVINDICACIONES

1. Una célula para ser utilizada en ensayos con anticuerpos contra un ligando extracelular seleccionado del grupo compuesto de una citocina y un factor de crecimiento, iniciando dicho ligando extracelular una señal específica de ligando en el núcleo de la célula, comprendiendo dicha célula:

- a) un primer constructo de ADN que tiene una secuencia que comprende un primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción, siendo dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción inducible por el ligando, y una porción codificadora de un primer producto génico indicador, activada por dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción, pudiendo ser detectado dicho primer producto génico indicador cuando el primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción es inducida por el ligando, comprendiendo dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción un elemento de control de transcripción seleccionado a partir del grupo compuesto de un elemento de respuesta a la estimulación con IFN (ISRE), una secuencia activada por gamma (GAS), un sitio de reconocimiento NFkB, un transductor de señal y activador de transcripción # 5 (STAT5); y
- b) un segundo constructo de ADN con una secuencia que comprende:

- i) un segundo conjunto de uno o más elementos de control de transcripción diferente de dicho primer conjunto;
- ii) un segmento activado por dicho segundo conjunto de uno o más elementos de control de transcripción que codifica un segundo producto génico indicador, y dicho segundo producto génico indicador puede ser medido independientemente en presencia de dicho primer producto génico indicador y viceversa; y
- iii) en un cistrón separado, un segmento que codifica dicho ligando, también activado por dicho segundo conjunto de uno o más elementos de control de transcripción.

2. La célula de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de uno o más elementos de control de transcripción comprende un elemento de control de transcripción inducible.

3. La célula de la reivindicación 2, donde dicho elemento de control de transcripción inducible es un elemento de respuesta a tetraciclina (Tet) y en el que un represor de tetraciclina inverso (rTetR), que se expresa constitutivamente en la célula, desactiva/reprime la acción de dicho TRE inducible en ausencia de tetraciclina o doxiciclina como un inductor en un sistema de expresión Tet-On; o dicho elemento de control de transcripción es un elemento de respuesta (Tet) a tetraciclina (TRE) y en el que un transactivador controlado por tetraciclina (tTA) se fija a dicho TRE inducible en ausencia de tetraciclina o doxiciclina para activar la transcripción a partir de TRE como un sistema de expresión Tet-Off.

4. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en ensayos con anticuerpos neutralizantes que se unen a un anticuerpo contra un antagonista de dicha citocina o factor de crecimiento, comprendiendo además un tercer constructo de ADN que tiene una secuencia que incluye:

- i) un tercer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción diferente del primer y segundo conjunto;
- ii) un segmento activado por dicho tercer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción que codifica un tercer producto génico indicador, pudiendo dicho tercer producto génico indicador ser medido independientemente en presencia de dichos productos génicos indicadores primero y segundo; y (iii) en un cistrón separado, un segmento que codifica dicho antagonista, también activado por dicho tercer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción.

5. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho ligando es un interferón, factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), o eritropoyetina (EPO).

6. La célula de la reivindicación 5, donde cuando dicho ligando es un interferón dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción comprende un elemento de respuesta a estimulación con IFN (ISRE), o en la que cuando dicho ligando es un factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa) dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción comprende un sitio de unión NFkB, o en la que cuando dicho ligando es eritropoyetina (EPO) dicho primer conjunto de uno o más elementos de control de transcripción comprende un transductor de señal o elemento activador de transcripción # 5 (STAT5)

7. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho primero o segundo producto génico indicador es una luciferasa, preferentemente luciferasa de Renilla o luciferasa de luciérnaga, o en la que dicho primero y segundo productos génicos indicadores son luciferasas diferentes, preferiblemente luciferasa de renilla y luciferasa de luciérnaga.

8. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene la propiedad de mantener la actividad de la transducción de señal específica de ligando al núcleo durante al menos dieciocho horas pero perderá dicha actividad de transducción de señal específica de ligando y sufrirá muerte celular en no más de 14 días a una temperatura por encima del punto de congelación.

9. La célula de la reivindicación 8, donde la célula ha sido tratada con un agente anti-mitótico o pro-apoptótico para que adquiera dicha propiedad.

10. La célula de la reivindicación 9, donde dicho agente anti-mitótico o pro-apoptótico es seleccionado a partir del grupo compuesto de vinblastina, 5-fluorouracilo y mitomicina C.

11. La célula de la reivindicación 9 o 10, donde la célula tratada, sustancialmente inmediatamente después de ser tratada, ha sido suspendida en una solución que contiene un criopreservante y congelada a aproximadamente -80°C.

12. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es una célula de mamífero o aviar, preferentemente una célula humana.

13. Un kit para determinar el nivel en una muestra de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de una célula, que comprende:

un reactivo que contiene una pluralidad de la célula de la reivindicación 11 en estado congelado o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 12; y

o bien un dispositivo de prueba con una pluralidad de pocillos o un contenedor, preferentemente en que el kit es para ensayar anticuerpos neutralizantes con respecto a dicho ligando extracelular o un antagonista de dicho ligando extracelular.

14. El kit de la reivindicación 13, donde el nivel del ligando extracelular determinado en la muestra se utiliza para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes o contra el ligando extracelular o contra el antagonista del ligando extracelular.

15. Un método para determinar en una muestra el nivel de un anticuerpo neutralizante o bien contra el ligando extracelular o contra un antagonista del ligando extracelular, o de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de una célula que comprende:

incubar la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una mezcla con una muestra en la que se busca determinar el nivel del ligando extracelular o del anticuerpo neutralizante; y

determinar el nivel del primer producto génico indicador en la mezcla con respecto al nivel del primer producto génico receptor en ausencia de la muestra para determinar así el nivel en la muestra del ligando extracelular o anticuerpo neutralizante.

16. Un método para determinar en una muestra el nivel de un ligando extracelular que inicia una señal específica de ligando en el núcleo de una célula o de un anticuerpo neutralizante o bien contra el ligando extracelular o contra un antagonista del ligando extracelular que comprende:

descongelar la célula de la reivindicación 11 de su estado congelado en un periodo durante el que la célula descongelada mantiene la actividad de transducción de señal específica de ligando;

incubar la célula descongelada en una mezcla con una muestra en la que se pretende determinar el nivel del ligando extracelular anticuerpo neutralizante; y determinar el nivel del primer producto génico indicador en ausencia de la muestra para determinar así el nivel en la muestra del ligando extracelular o anticuerpo neutralizante.

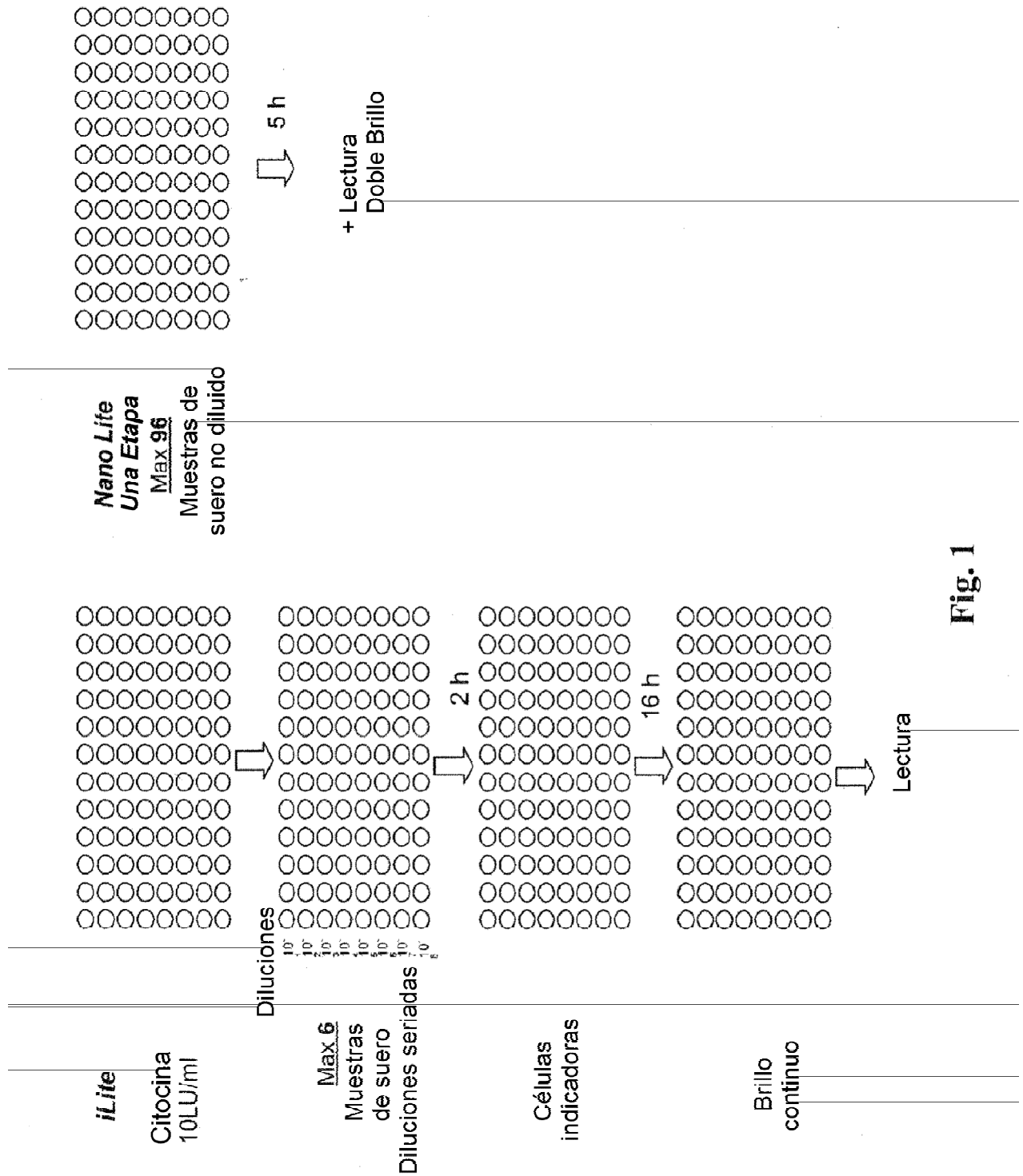


Fig. 1

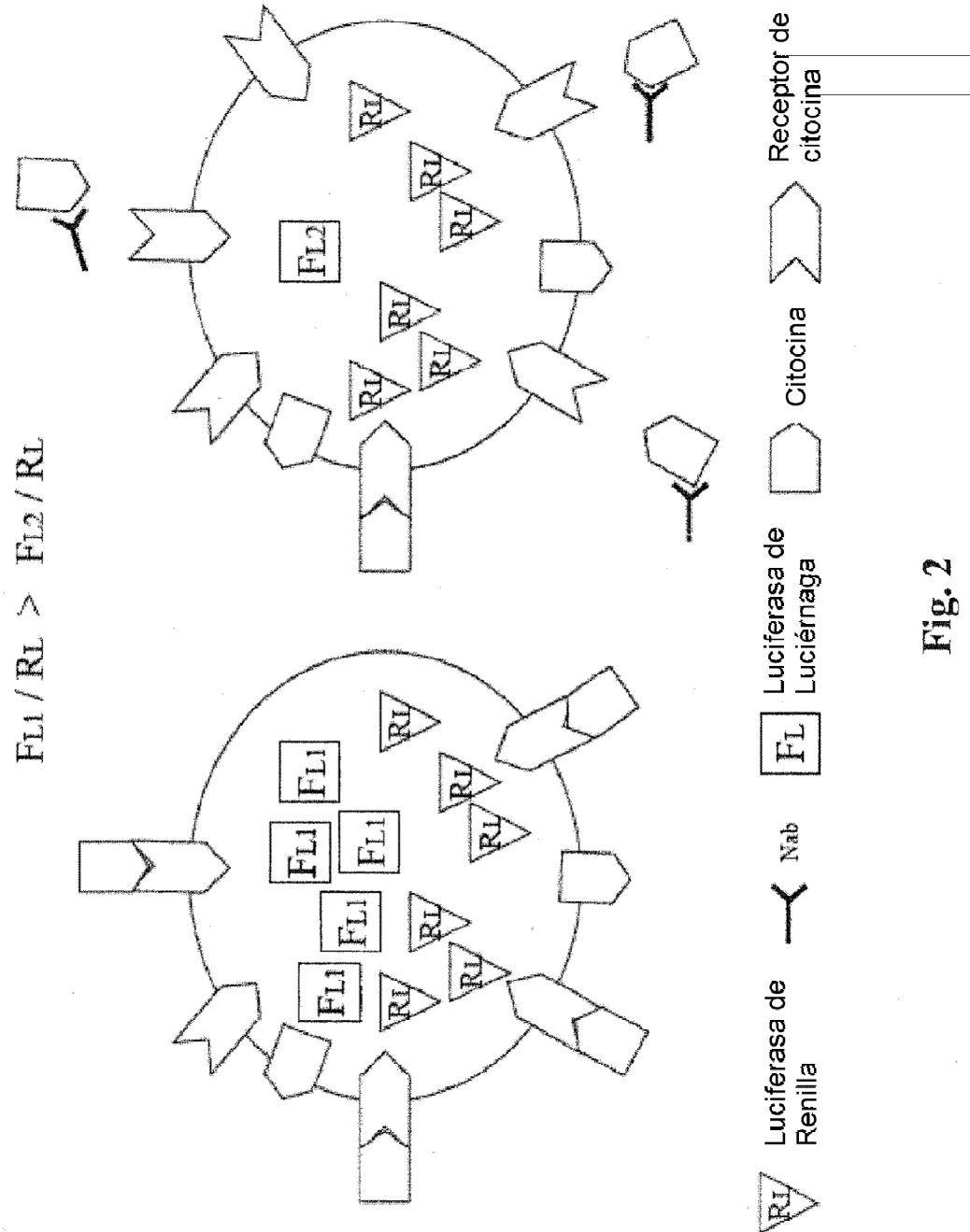


Fig. 2

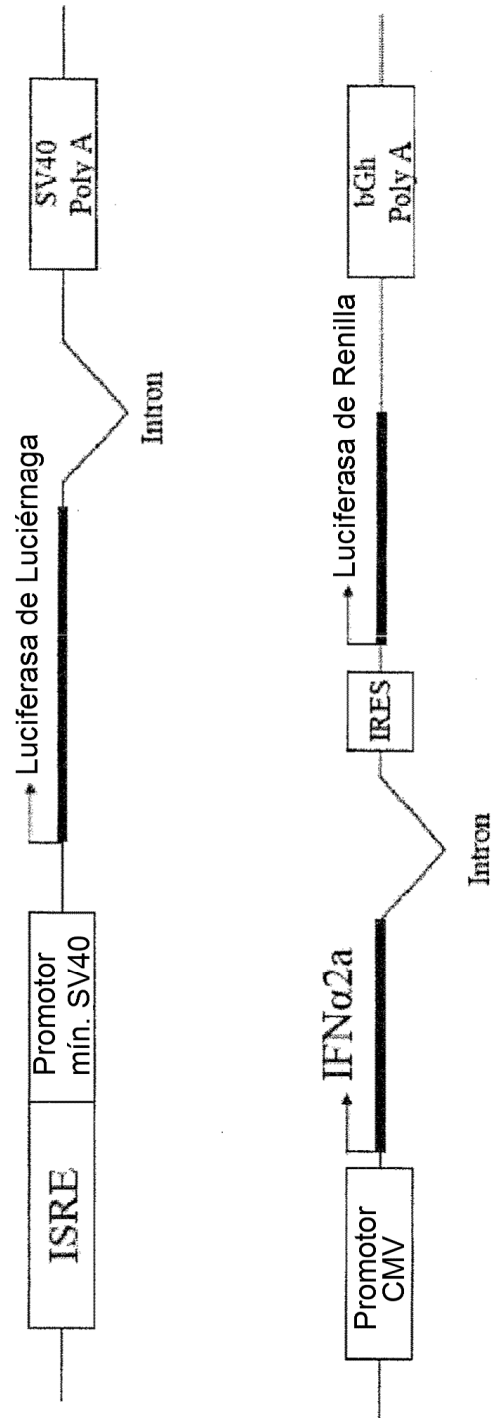


Fig. 3

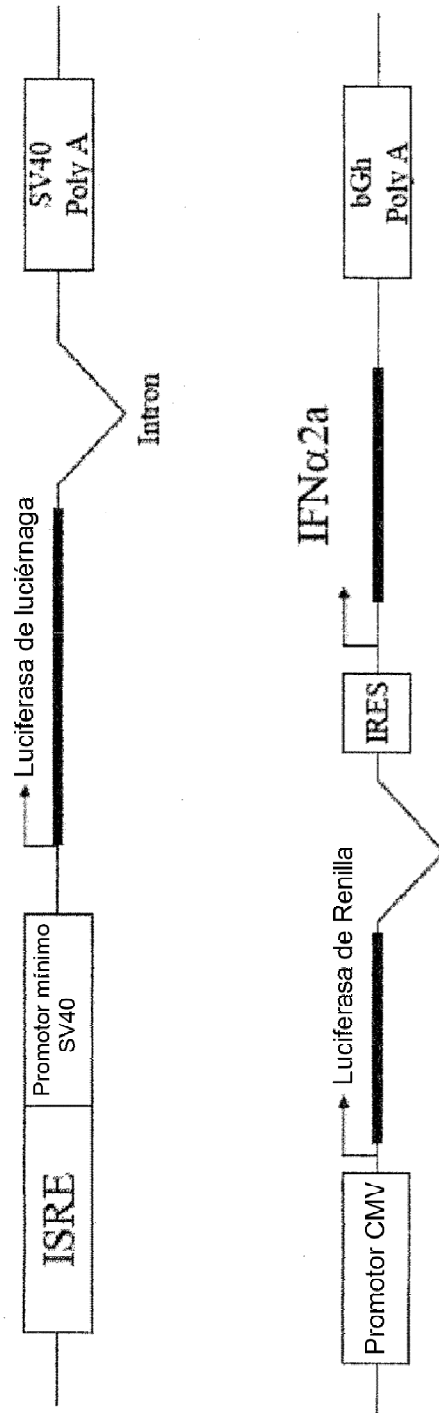


Fig. 4

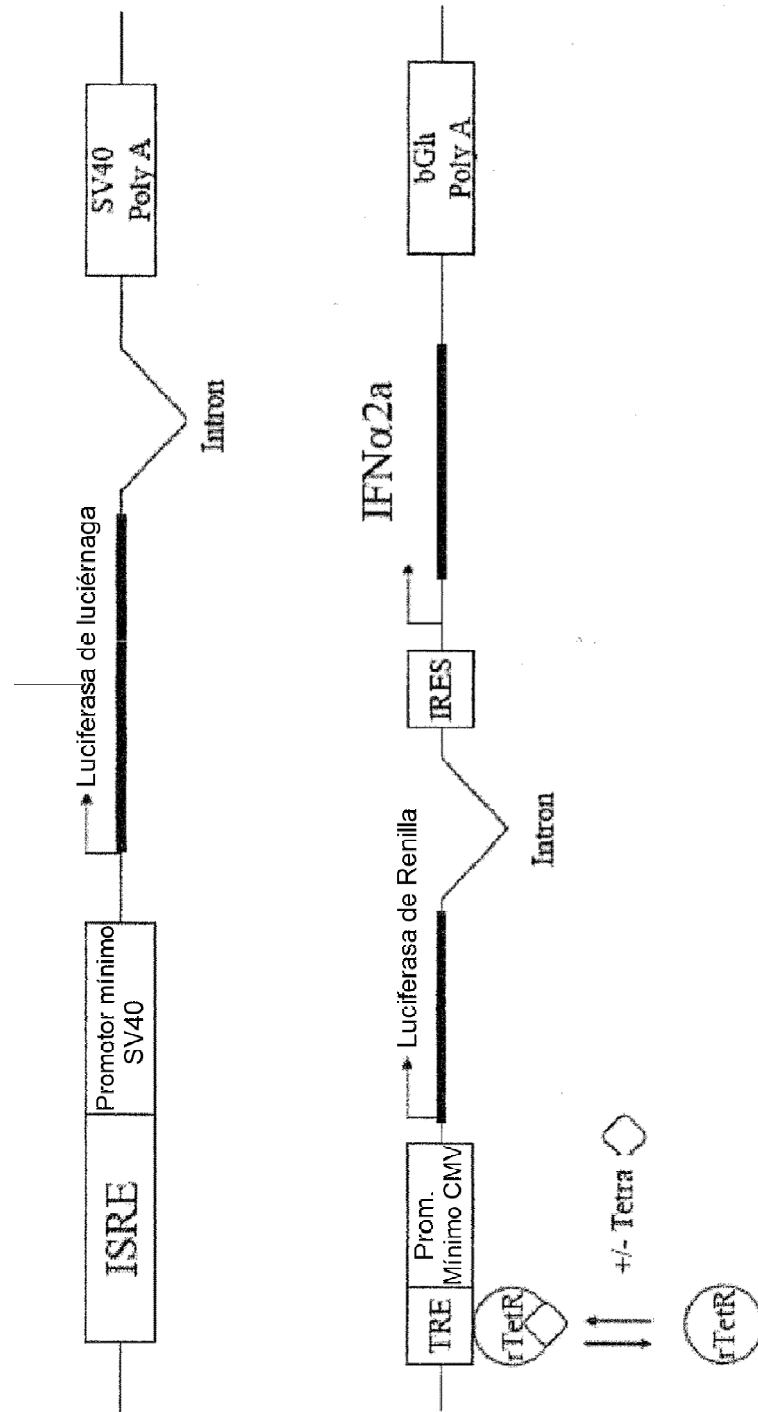


Fig. 5

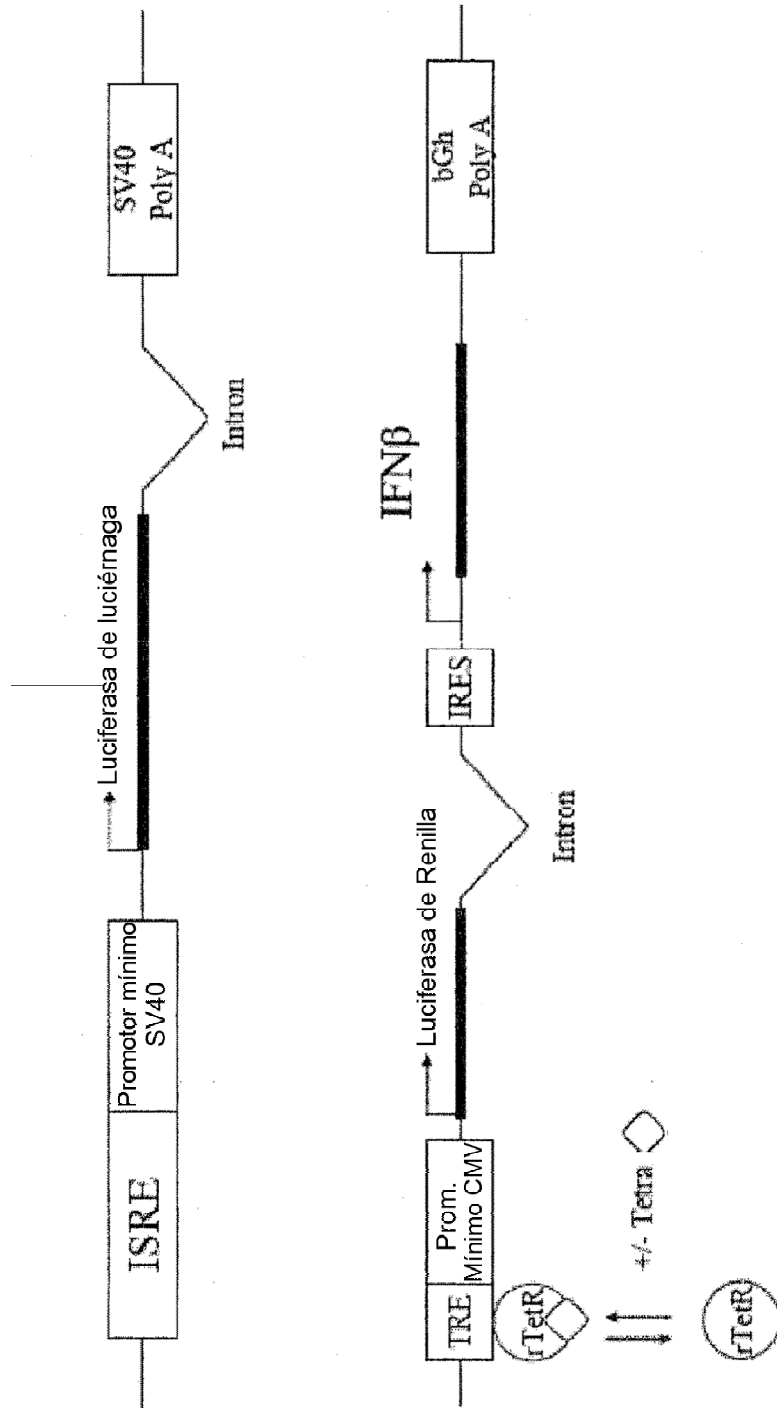


Fig. 6

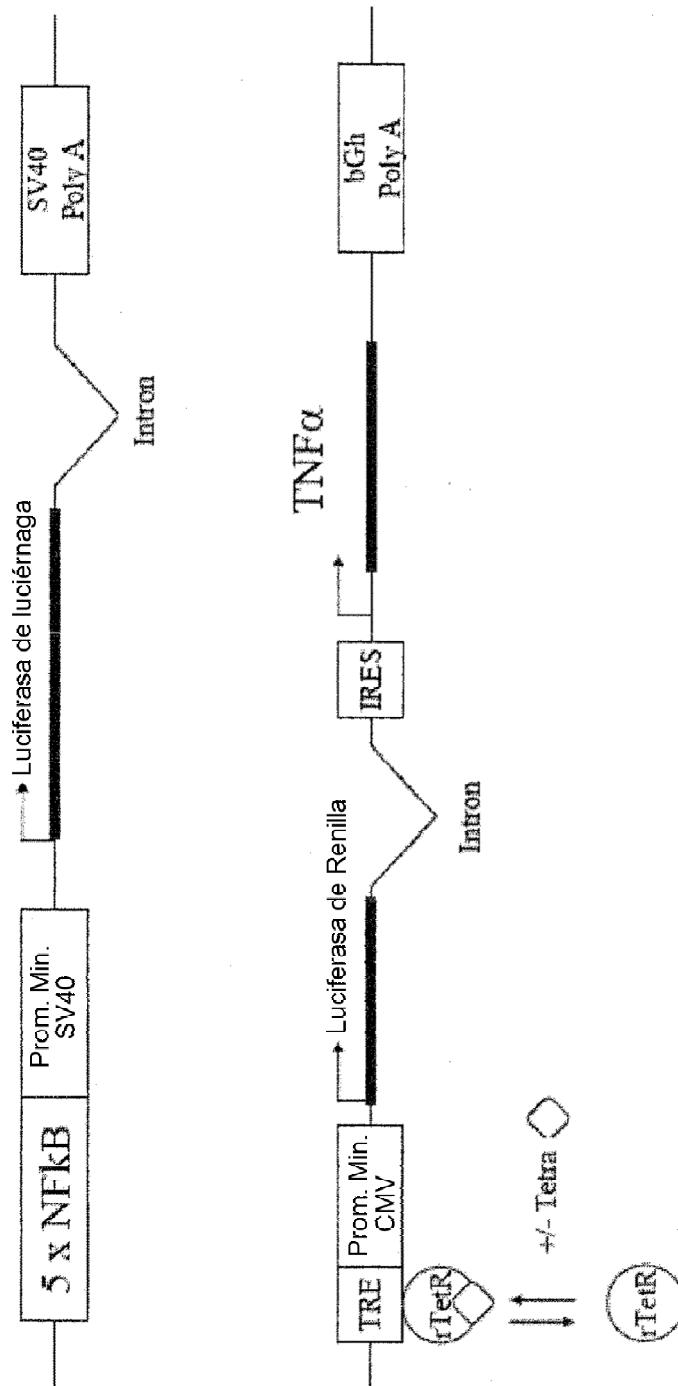


Fig. 7

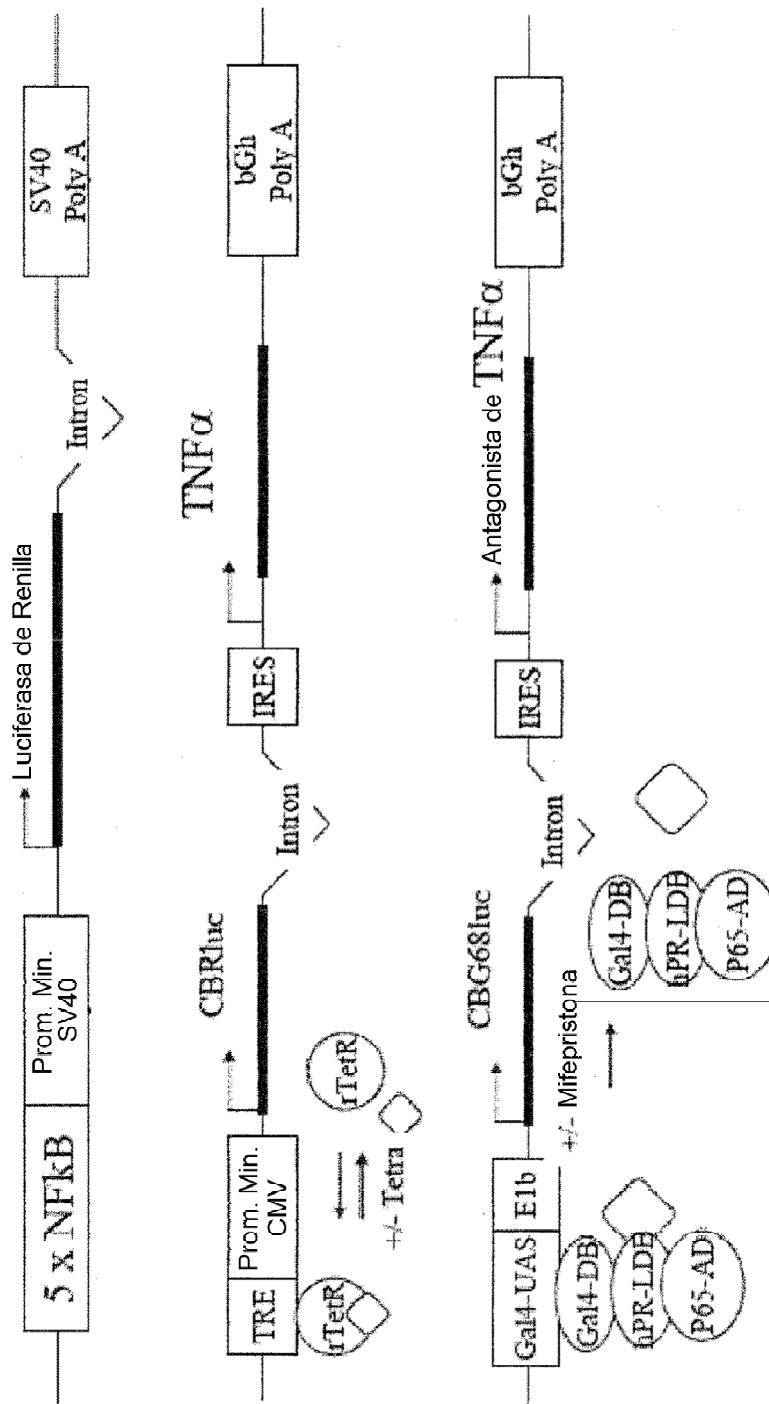


Fig. 8

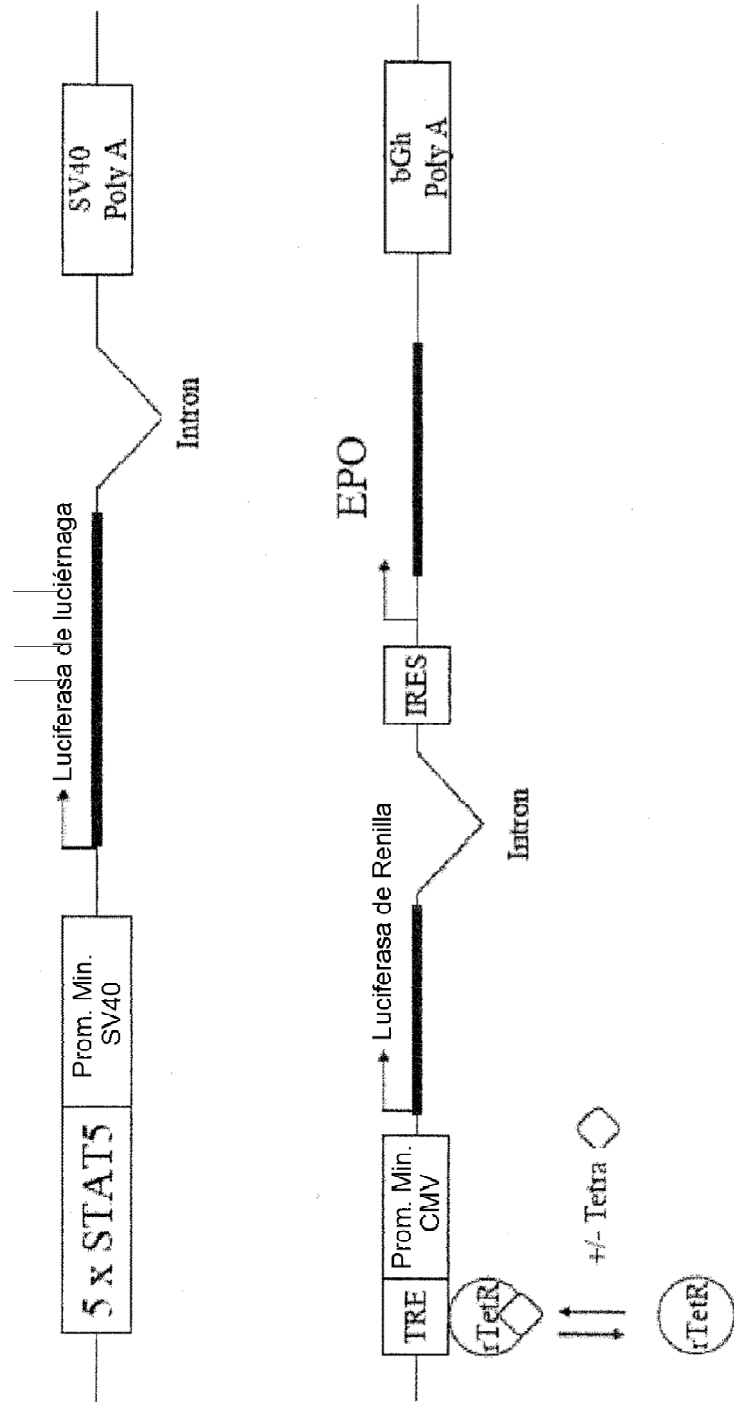


Fig. 9

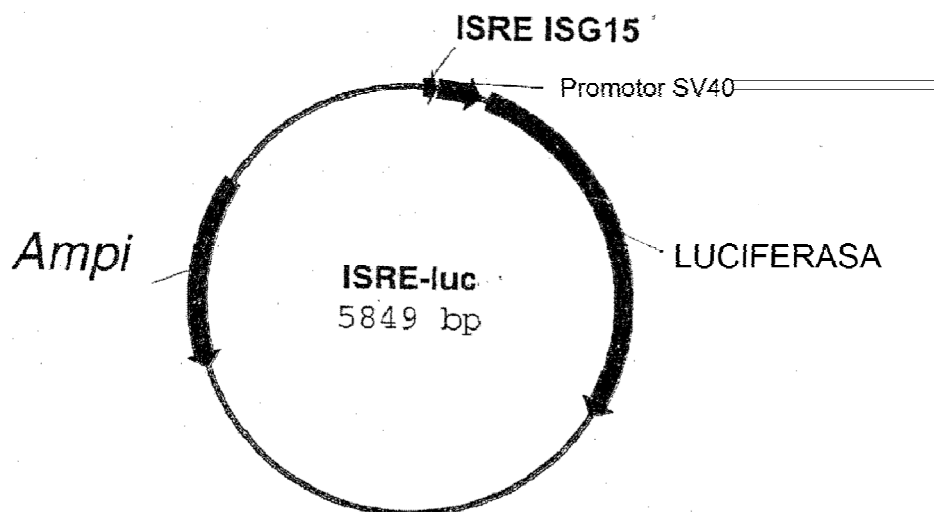


Fig. 10

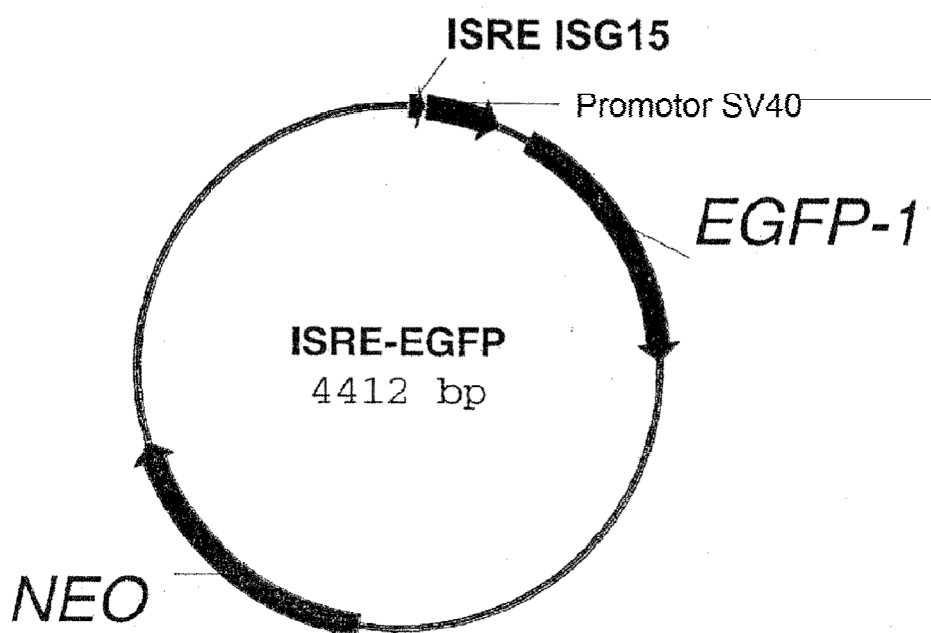


Fig. 11

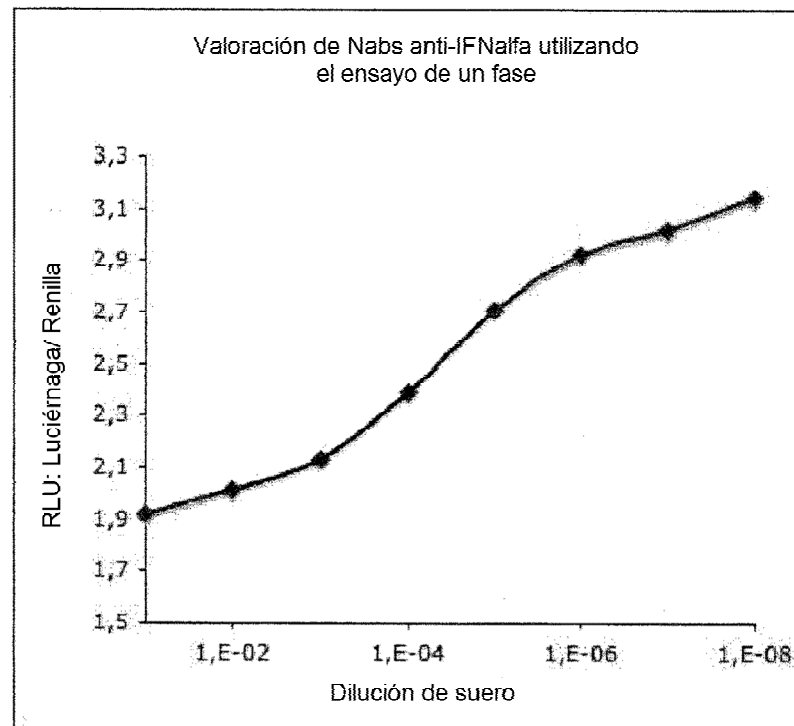


Fig. 12

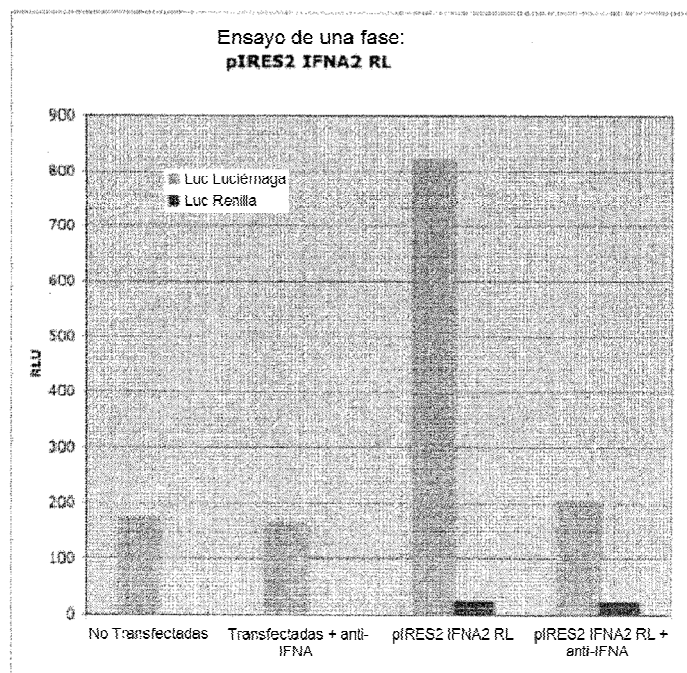


Fig. 13

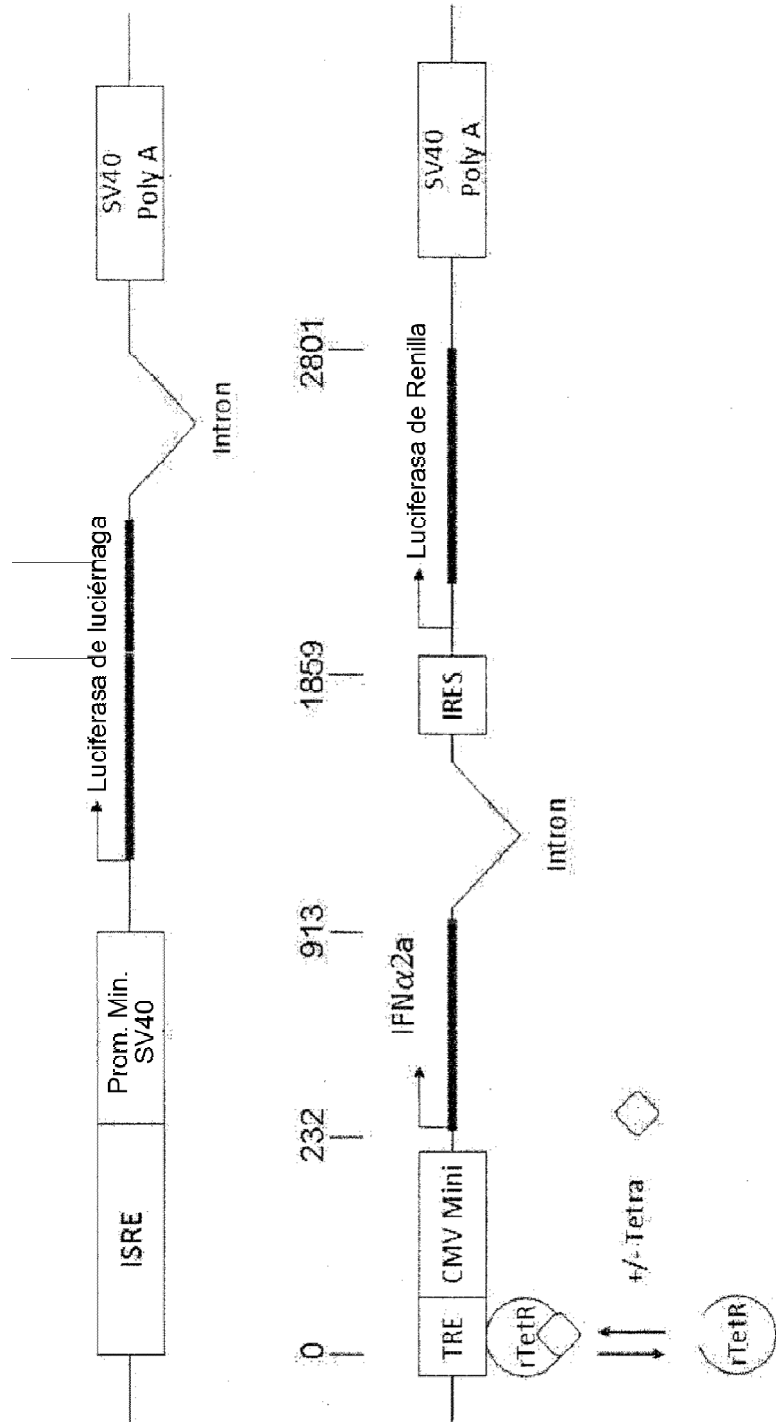


Fig. 14



Fig. 15B

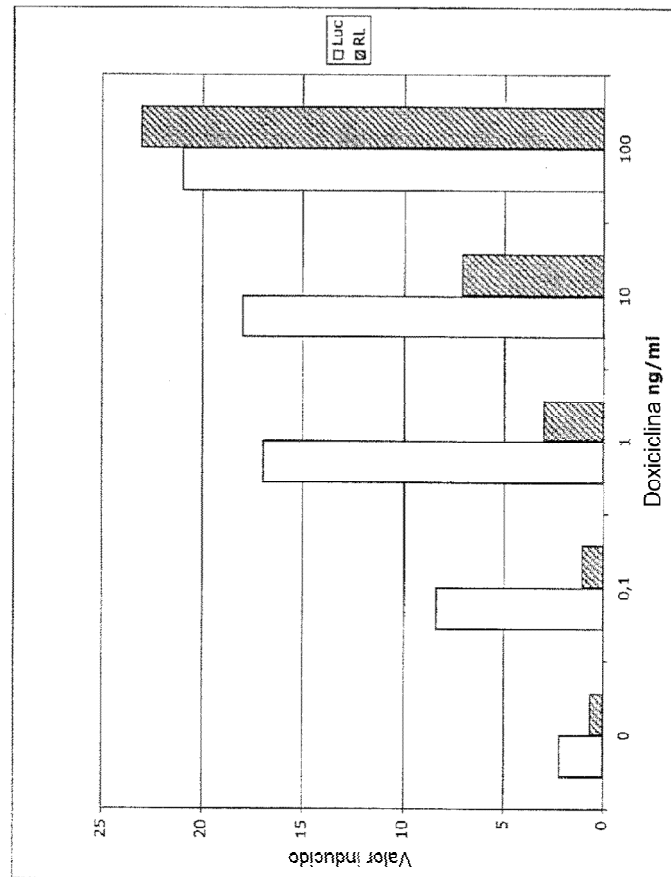


Fig. 15A

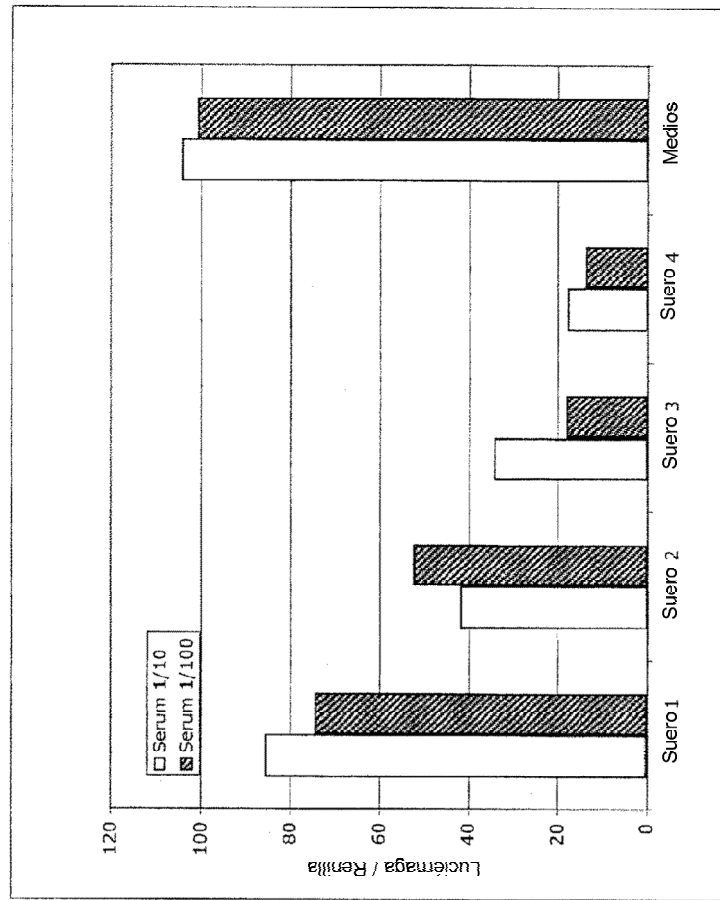


Fig. 16B

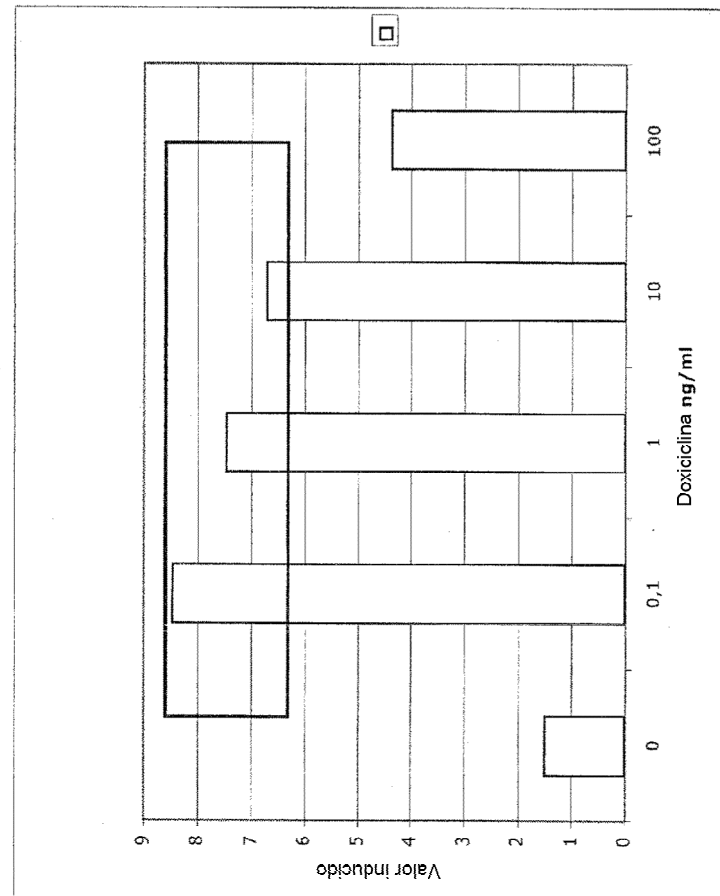


Fig. 16A

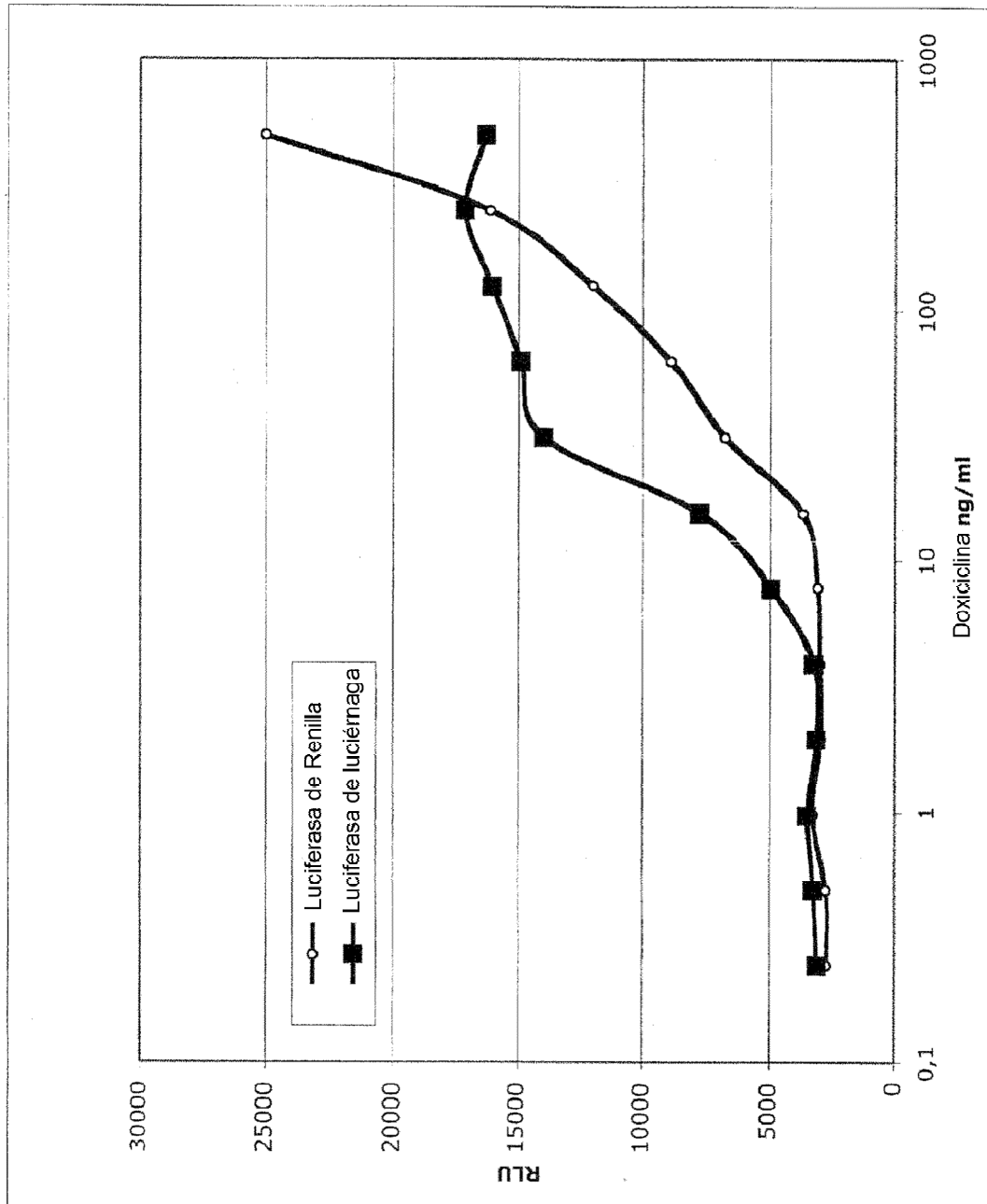


Fig. 17

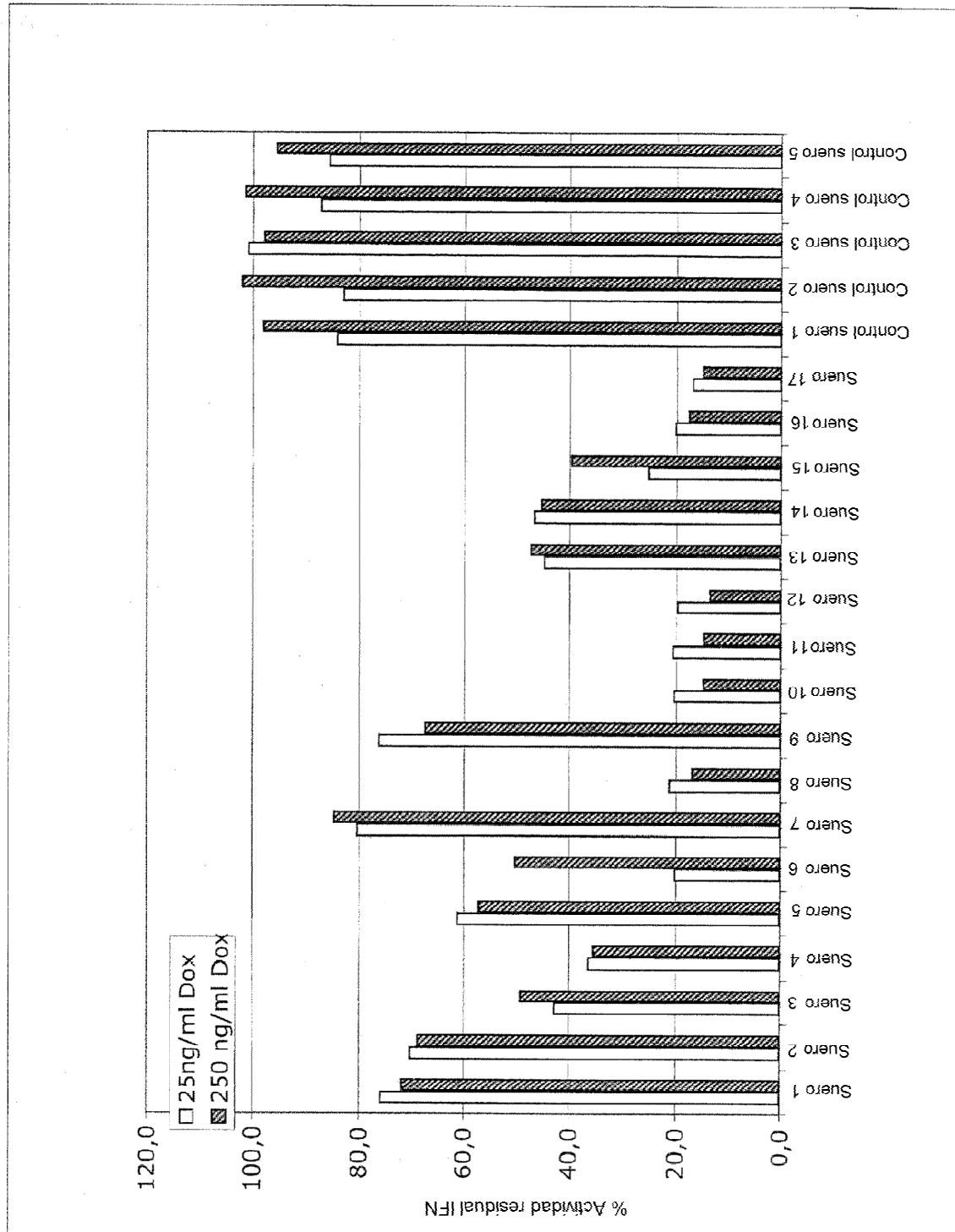


Fig. 18

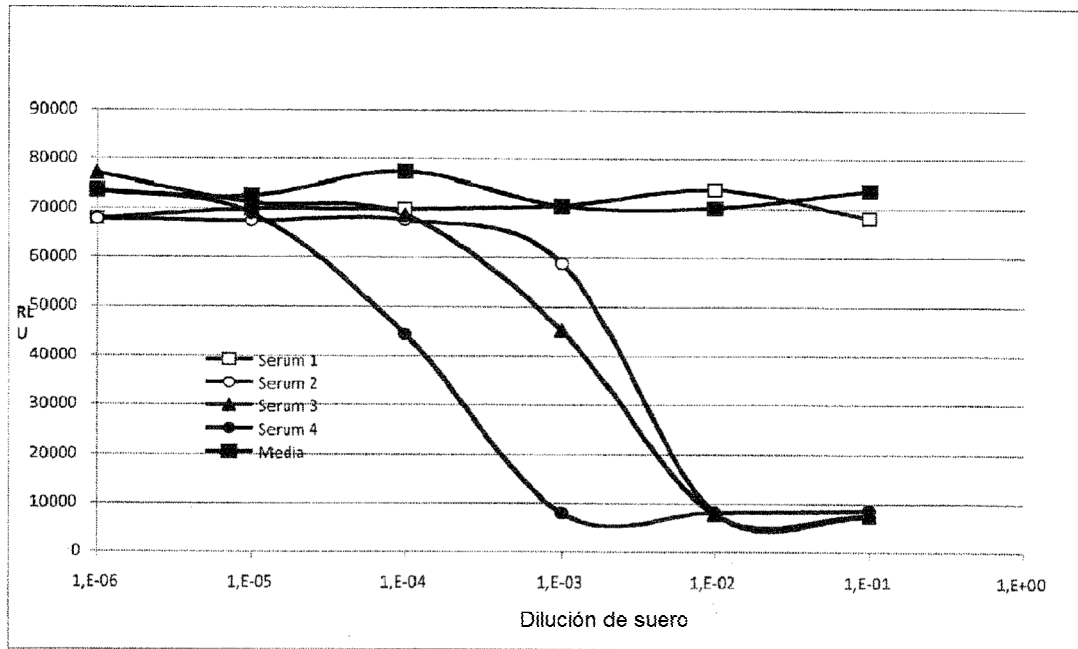


Fig. 19A

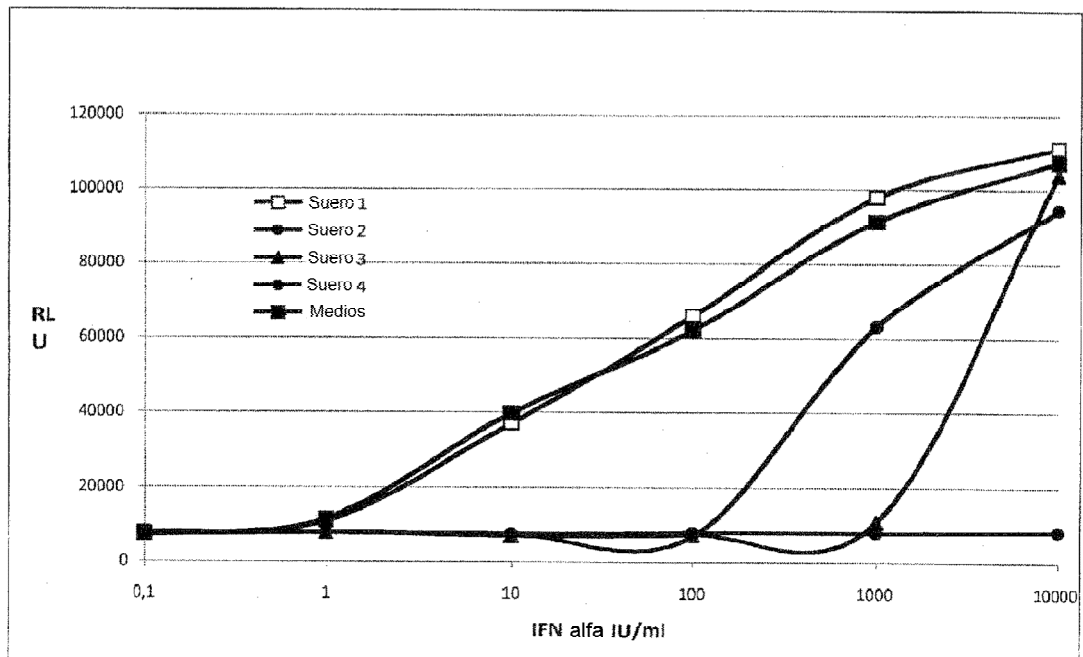


Fig. 19B

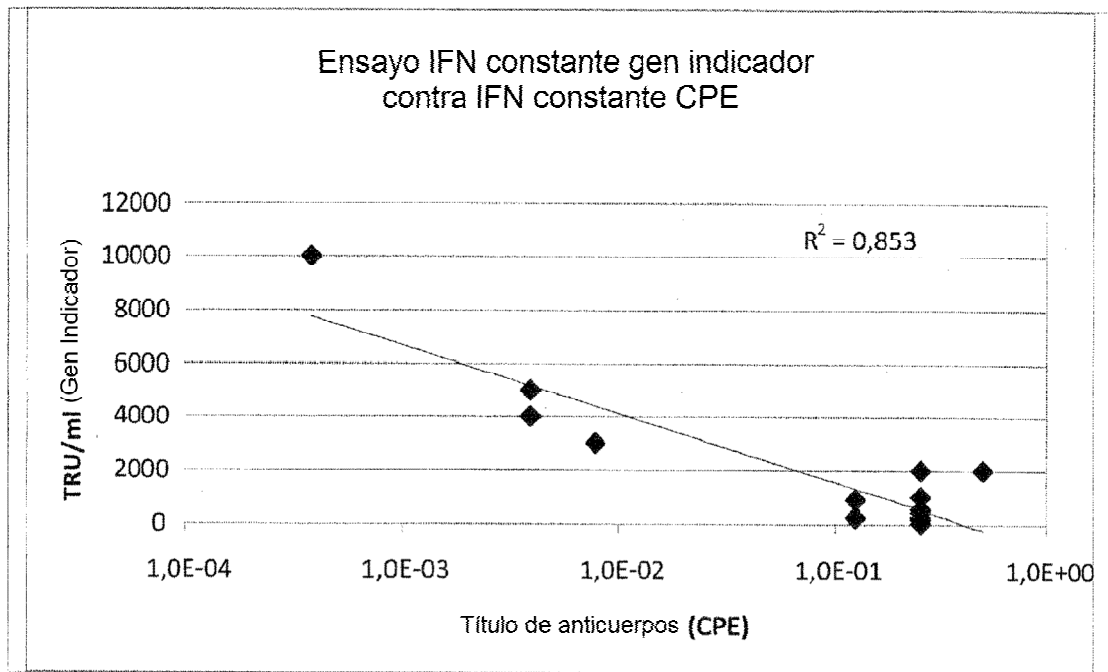


Fig. 20A

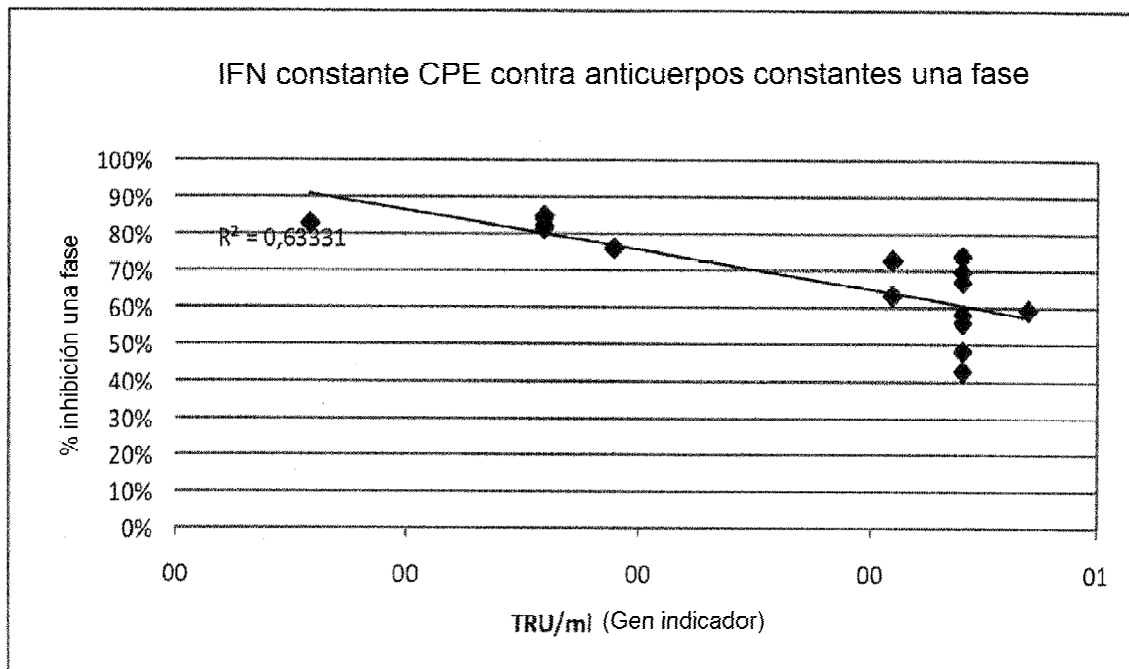


Fig. 20B

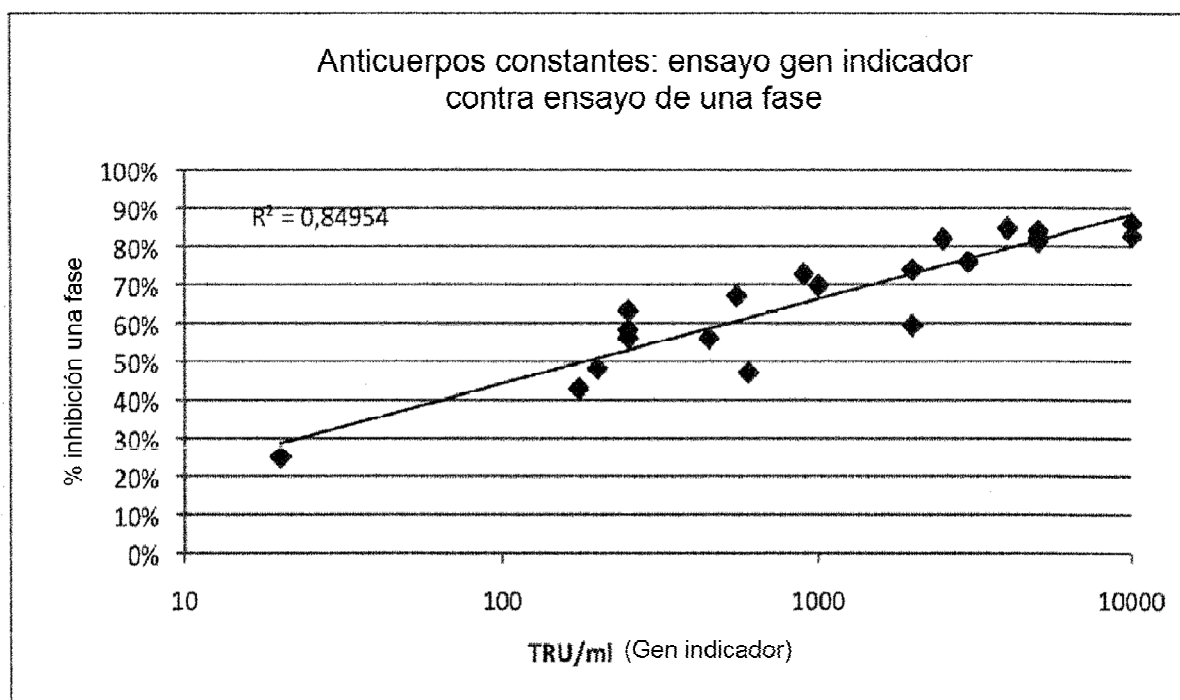


Fig. 20C