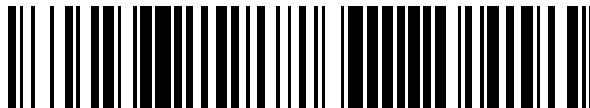


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 767**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/FR2012/052049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12767069 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2756305**

54 Título: **Procedimiento de determinación de la glicosilación de un anticuerpo**

30 Prioridad:

16.09.2011 FR 1158245

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

07.05.2019

73 Titular/es:

**CISBIO BIOASSAYS (100.0%)
Parc Marcel Boiteux
30200 Codolet, FR**

72 Inventor/es:

**JAGA, DELPHINE;
MOKRANE, HAMED;
MARTINEZ, STÉPHANE y
FINK, MICHEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 711 767 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

Procedimiento de determinación de la glicosilación de un anticuerpo

5 **Campo de la invención:**

La invención se refiere a un procedimiento de detección de la unión de un anticuerpo a un receptor de fragmentos cristalizables Fc (en adelante "receptores de Fc" o FcR) presentes en la superficie de una célula y también a un procedimiento de determinación del nivel de glicosilación de un anticuerpo.

10

Estado de la técnica

Los anticuerpos monoclonales recombinantes han permitido, desde hace algunos años, una revolución terapéutica. Aunque ya no hace falta demostrar su eficacia clínica, sigue conociéndose poco su modo de acción en los pacientes. El efecto terapéutico de los anticuerpos que seleccionan como diana antígenos de membrana pasa concretamente por el reclutamiento de células efectoras que expresan receptores para el fragmento cristizable de los anticuerpos (en adelante, "receptores de Fc").

15

Los receptores de Fc son proteínas presentes en la superficie de determinadas células que contribuyen a las funciones del sistema inmunitario, en particular, de las células NK ("*natural killer*", linfocitos citolíticos naturales), de los macrófagos, de los neutrófilos y de los mastocitos. Su nombre proviene de su capacidad para unirse a la región Fc (fragmento cristizable) de los anticuerpos. Existen varios tipos, que se clasifican en función del tipo de anticuerpo que reconocen: los receptores de Fc gamma (Fc γ R) se unen a IgG, el receptor de Fc alfa (Fc α R) se une a IgA y los receptores de Fc épsilon (Fc ϵ R) se unen a IgE.

20

25

La unión del receptor de Fc con un anticuerpo desencadena diferentes mecanismos en función de la naturaleza de la célula en la que se expresa ese receptor. La tabla 1 es un resumen de la distribución celular de los diferentes receptores de Fc y de los mecanismos desencadenados por la unión del receptor a un anticuerpo.

30

Tabla 1

Receptor	Anticuerpo reconocido	Distribución celular	Efecto tras la unión al anticuerpo
FcγRI (CD64)	IgG1 e IgG3	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	fagocitosis activación celular generación de oxígeno reactivo destrucción de microbios
FcγRIIA (CD32)	IgG	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Plaquetas Células de Langerhans	fagocitosis desgranulación (eosinófilos)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	Linfocitos B Mastocitos	ninguna fagocitosis inhibición de la actividad de las células
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	fagocitosis inhibición de la actividad de las células
FcγRIIA (CD16A)	IgG	Células NK Macrófagos (determinados tejidos)	inducción de la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos - (ADCC) inducción de la liberación de citocinas por los macrófagos
FcγRIIB (CD16b)	IgG	Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos Células dendríticas foliculares	destrucción de microbios
FcϵRI	IgE	Mastocitos Eosinófilos Basófilos Células de Langerhans	degranulación
FcϵRII (CD23)	IgE	Linfocitos B Eosinófilos Células de Langerhans	posible molécula de adhesión

FcαRI (CD89)	IgA	Monocitos Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	fagocitosis destrucción de microbios
Fcα / μR	IgA e IgM	Linfocitos B Células mesangiales Macrófagos	endocitosis destrucción de microbios
FcRn	IgG	Monocitos Macrófagos Células dendríticas Células epiteliales Células endoteliales Hepatocitos	transferencia de IgG de la madre al feto por la placenta transferencia de IgG de la madre al lactante en la leche Protege IgG frente a la degradación

Con respecto a la importancia de los mecanismos asociados con la unión de los receptores de Fc a los anticuerpos, sería particularmente ventajoso poder detectar esta unión cuando estos receptores están en un contexto celular, en particular en el contexto del desarrollo de anticuerpos o de fragmentos Fc con fines de diagnóstico o terapéuticos.

5 Actualmente se comercializan anticuerpos terapéuticos que desencadenan el mecanismo ADCC (Herceptin®, Cetuximab®) y que están indicados en el tratamiento de determinados cánceres: el fragmento Fc de estos anticuerpos se une a un receptor de Fc presente en las células NK, mientras que los dominios variables de estos anticuerpos reconocen un antígeno presente en células tumorales (Herceptin: Her2, Cetuximab: Her1). La unión de estos anticuerpos a la vez a una célula NK y a una célula cancerosa conlleva concretamente la destrucción de esta última mediante la activación del mecanismo ADCC.

10 Por otro lado, se sabe que la glicosilación del fragmento Fc de los anticuerpos influye en la afinidad de estos anticuerpos por los FcR, y por tanto en su capacidad para reclutar células efectoras. En particular, anticuerpos terapéuticos modificados que no comprenden o que comprenden pocos residuos fucosos a nivel de los grupos N-glicano del fragmento Fc provocan una fuerte respuesta ADCC a bajas concentraciones y con una eficacia mucho mejor en comparación con sus equivalentes fucosilados (Shields *et al*, J Biol Chem. 26 de julio de 2002; 277(30):26733-40, Suzuki *et al* Clin Cancer Res. 15 de marzo de 2007; 13(6): 1875-82). La unión de los anticuerpos a los FcR se ha medido en estos estudios mediante una valoración de tipo ELISA (acrónimo de “*enzyme linked immunosorbent assay*”, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), o bien de manera funcional, mediante la medición de la respuesta ADCC.

15 De manera general, un método de detección de la unión de anticuerpos potencialmente terapéuticos a los receptores de Fc expresados por una célula intacta sería una herramienta valiosa para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, o incluso para el estudio de mecanismos del sistema inmunitario mediados por los receptores de Fc. Las técnicas actualmente disponibles para estudiar la unión de anticuerpos a los receptores de Fc son relativamente tediosas.

20 El sistema comercializado con el nombre Biacore® permite la detección de interacciones entre dos parejas de unión y se basa en el fenómeno de la resonancia de plasmón superficial. Este sistema se ha usado para estudiar el efecto de la glicosilación de fragmentos Fc de anticuerpos sobre su unión al receptor de FcγRIII. Necesita la inmovilización del receptor de Fc o bien de un fragmento del dominio Fc del anticuerpo sometido a prueba con un microchip, capaz de generar una señal que depende del índice de refracción en su superficie (Biacore Journal Number 1, 2009, 15-17). Este enfoque presenta varios inconvenientes, concretamente una etapa crítica de fijación de una de las parejas de unión a la superficie del microchip, la necesidad de un equipo costoso que requiere una determinada práctica, y el hecho de que la técnica no permite trabajar con células vivas que expresan el receptor de Fc estudiado. Por otro lado, este enfoque tampoco proporciona información en cuanto a la eventual unión del anticuerpo sometido a prueba con su antígeno en su conformación celular.

25 La solicitud de patente francesa FR2844521 describe un enfoque según el cual se pone un anticuerpo en contacto con células que expresan el receptor CD16 en presencia del antígeno de dicho anticuerpo, y se mide al menos una citocina producida por las células, siendo un aumento de la cantidad de citocina representativo de la activación de dichas células. Esta técnica no permite la medición directa de la unión del anticuerpo al FcR. También necesita una etapa de centrifugación del sobrenadante para detectar las citocinas secretadas por las células.

30 La solicitud de patente europea EP 1 298 219 describe un método de valoración del efecto del fragmento Fc de un anticuerpo sobre una célula que expresa un FcR, que consiste en inmovilizar dicho anticuerpo sobre un soporte sólido, en cultivar células que expresan dicho receptor en presencia de dicho anticuerpo, y en medir el eventual efecto del FcR en presencia del anticuerpo. En este método, la activación del FcR también se mide de manera indirecta detectando la producción de citocinas por la célula. Esta técnica presenta los mismos inconvenientes que la descrita en la solicitud FR2844521, concretamente una etapa de centrifugación.

35 La solicitud de patente estadounidense US 2009/0176220 presenta una variante de los enfoques anteriores que

consiste en poner en contacto células que expresan FcR con anticuerpos que han sido objeto de una agregación previa. Como en las técnicas anteriores, la activación de las células se determina mediante la medición de citocinas secretadas por la célula.

5 La compañía Cisbio Bioassays comercializa una gama de productos con la denominación Tag-lite®, que permite el marcaje de proteínas expresadas por células mediante compuestos fluorescentes, así como compuestos fluorescentes parejas de FRET (HTRF®). Dado que el fenómeno de FRET entre un compuesto donador de energía y un compuesto aceptor depende de la distancia entre estos dos compuestos, los productos de la gama Tag-lite® permiten estudiar interacciones moleculares en un contexto celular. Una de las aplicaciones de esta técnica es el estudio de la interacción entre un receptor acoplado a las proteínas G (RCPG) marcado mediante una pareja de FRET, con su ligando marcado mediante una segunda pareja de FRET. Este enfoque permite, por ejemplo, efectuar valoraciones mediante competencia para evaluar la unión de nuevos ligandos potenciales de estos RCPG. Otro ejemplo de aplicación de estos productos es el estudio de la dimerización de RCPG marcados mediante compuestos parejas de FRET.

15 En la actualidad no existe ningún método que permita medir directamente la unión de un anticuerpo a un receptor de Fc expresado en la superficie de una célula intacta. Las técnicas existentes presentan varios inconvenientes: valoraciones indirectas de citocinas secretadas por las células, etapas de centrifugación poco adaptadas a una puesta en práctica automatizada, o incluso el uso de enfoques que necesitan etapas preliminares tediosas y cuya puesta en práctica es relativamente larga. Estas técnicas tampoco permiten obtener de manera fácil y rápida información sobre el nivel de glicosilación de un anticuerpo dado y su efecto sobre la unión a los receptores de Fc.

Los inventores han puesto a punto un método que permite resolver estos problemas.

25 Descripción

La solicitud describe un procedimiento *in vitro* de determinación de la unión de un anticuerpo con un receptor de Fc expresado en membranas celulares o células intactas presentes en un medio de medición, que comprende las siguientes etapas:

30 (i) marcaje directo o indirecto de dicho receptor de Fc mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET, o bien introducción en el medio de membranas celulares o de células intactas cuyos receptores de Fc se han marcado previamente de manera directa mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET;

35 (ii) adición en el medio de medición de dicho anticuerpo, marcado de manera directa o indirecta mediante el segundo miembro de dicho par de parejas de FRET;

40 (iii) medición de la señal de FRET, siendo la existencia de una señal de FRET representativa de la unión del anticuerpo al receptor de Fc.

Este procedimiento puede usarse concretamente para determinar la constante de disociación de un complejo receptor de Fc-anticuerpo. En este caso, se repite con diferentes concentraciones de anticuerpo, en particular concentraciones crecientes de anticuerpo, con el fin de establecer una curva de saturación, que representa la evolución de la señal de FRET en función de la concentración de anticuerpo. Esta curva permite determinar la constante de disociación ("Kd"), correspondiente a la concentración de anticuerpo al 50% de la saturación del receptor de Fc.

La invención se refiere a un formato de valoración mediante competencia. Por tanto, la invención consiste en un procedimiento *in vitro* de determinación de la unión de un anticuerpo (en adelante "anticuerpo competidor") con un receptor de Fc expresado en membranas celulares o células intactas presentes en un medio de medición, mediante competencia con un anticuerpo de referencia, que comprende las siguientes etapas:

55 (i) marcaje directo de dicho receptor de Fc mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET, o bien introducción en el medio de membranas celulares o de células intactas cuyos receptores de Fc se han marcado previamente de manera directa mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET;

(ii) adición en el medio de medición del anticuerpo competidor;

60 (iii) adición en el medio de medición de un anticuerpo de referencia, marcado de manera directa mediante el segundo miembro de dicho par de parejas de FRET;

(iv) medición de la señal de FRET, siendo una disminución de la señal medida en presencia del anticuerpo competidor con respecto a la medida en su ausencia representativa de la unión de este anticuerpo al receptor de Fc;

65 caracterizado porque el receptor de Fc se marca de manera directa mediante una enzima suicida, a saber, que se expresa en forma de una proteína de fusión que comprende el receptor de Fc y la enzima suicida, y que el marcaje

se realiza mediante adición al medio de medición del sustrato de la enzima, conjugado a una de las parejas de FRET.

5 Las etapas (i) (ii) y (iii) se ponen en práctica preferiblemente en este orden, pero es posible poner en contacto los diferentes elementos en un orden diferente (por ejemplo ((i), (iii), (ii)), o incluso simultáneamente.

La etapa (iv) se pone en práctica tras un tiempo de incubación que puede ir de algunos minutos (por ejemplo 3, 4, 5 minutos) a varias horas (por ejemplo, de 1 a 20 horas).

10 Si se conoce la concentración del anticuerpo competidor, entonces puede compararse la señal obtenida en la etapa (iv) con la señal medida cuando se pone en práctica el procedimiento con un anticuerpo de referencia no marcado en lugar del anticuerpo competidor, y concluir en cuanto a la afinidad de este último por el receptor de Fc. En particular, a igual concentración, si la señal de FRET medida en presencia del anticuerpo competidor es inferior a la medida en presencia del anticuerpo de referencia no marcado, entonces el anticuerpo competidor tiene una afinidad mejor que este último, y a la inversa. El anticuerpo de referencia no marcado puede ser el mismo que el de la etapa (iii), o bien otro anticuerpo con el que se desea comparar el anticuerpo competidor.

20 Por otro lado, cuando el procedimiento de valoración mediante competencia anterior se repite en presencia de diferentes cantidades de anticuerpo que van a someterse a prueba y de una cantidad fija de anticuerpo de referencia, los resultados obtenidos permiten determinar la CE50 del anticuerpo competidor. La CE50 del anticuerpo puede compararse con la del anticuerpo de referencia, siendo el anticuerpo que tiene la CE50 más baja el que tiene una mejor afinidad por el receptor de Fc. Por "CE50" se entiende la concentración que permite alcanzar el 50% de un efecto dado. En este caso, la CE50 de un anticuerpo competidor corresponderá a la concentración de este anticuerpo que inhibe el 50% de la unión del anticuerpo de referencia al receptor de Fc. El experto en la técnica está familiarizado con esta noción y hay programas informáticos disponibles para calcular automáticamente las CE50 a partir de los resultados obtenidos en el contexto de la puesta en práctica anterior.

30 Debe observarse que el procedimiento según la invención no necesita que el anticuerpo competidor se use de forma purificada: puede estar incluido en una mezcla, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo de células que producen este anticuerpo. Una de las ventajas del procedimiento de la invención es poder estudiar anticuerpos no purificados, ya que no necesita etapas tediosas de preparación de los anticuerpos que van a someterse a prueba.

35 Los procedimientos anteriores se ponen en práctica con receptores de Fc expresados en membranas celulares o células intactas. Estas membranas pueden prepararse de manera clásica a partir de células sometidas a un tratamiento químico o mecánico. El término "membranas celulares" incluye las membranas de células intactas, y la puesta en práctica de la invención con células intactas es particularmente ventajosa y preferida ya que el procedimiento se realiza entonces en un contexto relativamente próximo a la realidad biológica.

40 Por "anticuerpo de referencia" se entiende un anticuerpo del que se sabe con seguridad que se fija al receptor de Fc. Por tanto, si el receptor de Fc es un receptor de Fc gamma (Fc γ R), el anticuerpo de referencia podrá ser cualquier anticuerpo de la clase de las IgG, independientemente de su especificidad epitópica. Asimismo, si el receptor de Fc es un receptor de Fc alfa o épsilon, el anticuerpo de referencia podrá ser cualquier anticuerpo de la clase de las IgA o de las IgE, respectivamente.

45 De manera inesperada, el procedimiento según la invención es lo suficientemente sensible como para permitir la observación de variaciones de afinidad cuando se realizan determinadas modificaciones en los anticuerpos. Más precisamente, los inventores han descubierto que las modificaciones conocidas para aumentar o disminuir la afinidad de un anticuerpo con un receptor de Fc estaban correlacionadas con variaciones de CE50 medidas con el procedimiento según la invención.

50 Por tanto, en una realización particular, el anticuerpo de referencia y el anticuerpo competidor difieren concretamente en que este último se ha preparado según un procedimiento, o bien ha sido objeto de un tratamiento, destinado a alterar el nivel de glicosilación de su fragmento Fc.

55 En particular y en una realización preferida, el anticuerpo que va a someterse a prueba se ha preparado según un procedimiento, o bien ha sido objeto de un tratamiento, destinado a alterar la fucosilación de su fragmento Fc. Tales procedimientos y tratamientos los conoce el experto en la técnica y se usan para mejorar la eficacia de determinados anticuerpos terapéuticos. Estos tratamientos, descritos entre otros por Yamane-Ohnuki *et al.* (MAbs. mayo-junio de 2009; 1(3):230-6) son de tres tipos:

60 - Procedimiento de producción de anticuerpos mediante ingeniería genética en organismos eucariotas (levaduras) o células vegetales en los que las vías de N-glicosilación se han modificado para hacer que sean más próximas a las de los mamíferos: este enfoque consiste en desactivar determinados genes implicados en los mecanismos de N-glicosilación de estos organismos y en introducir otros genes que son específicos de las vías de N-glicosilación de los mamíferos.

65

5 - Procedimiento de producción de anticuerpos mediante ingeniería genética en células de mamíferos (1) que tienen de manera natural una actividad intrínseca de fucosilación α -1,6 limitada, o (2) en las que los mecanismos de fucosilación α -1,6 se han inhibido mediante la introducción de pequeñas cadenas de ARN de interferencia (conocidos con el acrónimo ARNip), o incluso (3) en las que se ha introducido el ADN que codifica para la β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (GnTIII) y codificando este para la α -manosidasa II (ManII) del Golgi, o finalmente (4) cuya función de fucosilación α -1,6 se ha inhibido a nivel del locus genómico responsable de esta vía de glicosilación.

10 - Control de la fucosilación de anticuerpos *in vitro*, mediante tratamiento con enzimas que catalizan la fucosilación de proteínas no fucosiladas o bien fucosilasas capaces de escindir los residuos de azúcar de proteínas fucosiladas.

La invención permite someter fácilmente a prueba los anticuerpos así obtenidos para determinar su capacidad a unirse a los receptores de Fc, lo cual constituye una información muy valiosa ya que es indicativa de la potencial eficacia terapéutica de estos anticuerpos.

15 Una variante de la invención permite determinar el nivel de glicosilación de un anticuerpo que va a someterse a prueba. Se caracteriza porque comprende las siguientes etapas:

20 - puesta en práctica del procedimiento de valoración mediante competencia con varios anticuerpos competidores que tienen niveles conocidos de glicosilación o de desglucosilación, repitiéndose este procedimiento en presencia de diferentes cantidades de cada anticuerpo competidor y de una cantidad fija de anticuerpo de referencia, después

25 - puesta en práctica del procedimiento de valoración mediante competencia, pero esta vez con el anticuerpo que va a someterse a prueba como anticuerpo competidor, repitiéndose este procedimiento en presencia de diferentes cantidades de anticuerpo que va a someterse a prueba y de una cantidad fija de anticuerpo de referencia, y

- determinación del nivel de glicosilación del anticuerpo sometido a prueba mediante comparación de su CE50 con la de cada uno de los anticuerpos competidores cuyos niveles de glicosilación o de desglucosilación se conocen.

30 Este procedimiento permite en particular determinar el nivel de fucosilación de un anticuerpo.

35 Estas últimas puestas en práctica que permiten el estudio de anticuerpos cuya glicosilación o fucosilación se ha limitado de una manera u otra, están particularmente adaptadas al caso en el que el receptor de Fc es un receptor de Fc gamma y en particular el receptor CD16a o una de sus variantes, cuya unión a los fragmentos Fc de los anticuerpos de la clase de las IgG1 se sabe que está asociada al nivel de fucosilación de estos anticuerpos. En la medida en que el nivel de fucosilación de los anticuerpos está directamente correlacionado con la intensidad de la respuesta de la célula efectora, por ejemplo, con la intensidad de la respuesta ADCC, este procedimiento permite predecir la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta mediante la célula efectora.

40 En las puestas en práctica anteriores, también pueden usarse membranas celulares cuyos receptores se han marcado previamente (y las membranas celulares eventualmente congeladas), y la etapa (i) consiste en la introducción en el medio de medición de membranas celulares cuyos receptores de Fc se han marcado previamente de manera directa mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET. En el caso en el que se usan células marcadas congeladas, habrán sido objeto de un lavado tras su descongelación y previamente a su adición en el medio de medición.

45 Los términos usados anteriormente tienen los siguientes significados:

50 "Par de parejas de FRET": esta expresión designa un par constituido por un compuesto fluorescente donador de energía (en adelante "compuesto fluorescente donador") y por un compuesto aceptor de energía (en adelante "compuesto aceptor"); cuando se encuentran en proximidad uno de otro y cuando se excitan a la longitud de onda de excitación del compuesto fluorescente donador, estos compuestos emiten una señal de FRET. Se sabe que para que dos compuestos fluorescentes sean parejas de FRET, el espectro de emisión del compuesto fluorescente donador debe recubrir parcialmente el espectro de excitación del compuesto aceptor.

55 "Señal de FRET": designa cualquier señal medible representativa de un FRET entre un compuesto fluorescente donador y un compuesto aceptor. Por tanto, una señal de FRET puede ser una variación de la intensidad o del tiempo de vida de luminiscencia del compuesto fluorescente donador o del compuesto aceptor cuando este último es fluorescente.

60 "Medio de medición": designa el contenido del pocillo de una placa, de un tubo de ensayo o de cualquier otro recipiente apropiado para el mezclado de células o de membranas celulares con los reactivos necesarios para la puesta en práctica de la invención.

65 El receptor de Fc se elige de los receptores de la tabla 1, y de manera preferida es el receptor CD16a (Fc γ RIIIa) o una de sus variantes. Se conocen varias variantes de este receptor, en particular las variantes naturales L66H,

L66R, G147D, Y158H, F203S, F176V (o F158V en determinadas publicaciones). En una realización preferida, es la variante V158 (o V176) la que se usa. En otra realización es la variante F158 (o F176).

A continuación, se describen los diferentes medios de marcaje del receptor de Fc, pero según la invención el receptor de Fc se marca de manera directa mediante una enzima suicida, pudiendo esta enzima elegirse en particular de: los mutantes de la deshalogenasa, o un fragmento de la proteína de transporte de acilos, los mutantes de la O6-alquilguanina ADN alquiltransferasa, prefiriéndose estos últimos. Tal como se indica por otro lado, este método de marcaje del receptor de Fc implica que las células hayan sido objeto de un tratamiento previo que permite la expresión de una proteína de fusión que comprende el receptor de Fc y la enzima suicida. El marcaje se realizará mediante adición del sustrato de la enzima, conjugado a uno de los miembros del par de parejas de FRET.

Asimismo, a continuación, se describen los medios de marcaje del anticuerpo marcado mediante fluoróforo, pero de manera preferida este anticuerpo se marca de manera directa mediante unión covalente con una de las parejas de FRET.

En una realización particular, el receptor de Fc se marca mediante el compuesto aceptor y el anticuerpo mediante el compuesto donador. En otra realización, el receptor de Fc se marca mediante el compuesto donador y el anticuerpo mediante el compuesto aceptor. Se prefiere esta última realización.

Marcaje del receptor de Fc

(a) Acoplamiento del receptor de Fc con un donador o un aceptor de manera indirecta (no covalente), acoplamiento no comprendido en la presente invención

El donador o el aceptor pueden acoplarse con el receptor de Fc mediante una proteína capaz de asociarse al receptor de Fc, marcándose esta propia proteína de manera directa o indirecta mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET. Por ejemplo, se conoce que el receptor de Fc γ R111A (CD16a) se asocia en la membrana celular a la cadena gamma del receptor de Fc ϵ R1 o a la subunidad zeta de CD3; el receptor CD16a puede marcarse por tanto de manera indirecta a través de estas cadenas gamma o zeta, a su vez marcadas directamente mediante un compuesto fluorescente.

El donador o el aceptor puede acoplarse con el receptor de Fc por medio de un par de parejas de unión del que al menos una es de naturaleza proteica. En este enfoque, el receptor de Fc se fusiona con la pareja de unión de naturaleza proteica mediante las técnicas clásicas de biología molecular (construcción de un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el receptor de Fc, fusionada con la que codifica para la pareja de unión proteica, e introducción del vector de expresión en la célula). El donador o el aceptor se conjuga de manera covalente a la otra pareja de unión, que en este caso se denomina agente de acoplamiento, que a continuación se añadirá al medio extracelular. El reconocimiento de las parejas de unión permite el marcaje indirecto del receptor de Fc mediante el donador o el aceptor.

A modo de ejemplo no limitativo de este tipo de parejas de unión, pueden mencionarse:

- El par constituido por un anticuerpo específico para un epítipo presente de manera natural en el receptor de Fc, marcado mediante un compuesto fluorescente, y este epítipo. Cuando se usa este método de marcaje, conviene verificar que la unión de este anticuerpo a este epítipo no entorpece la unión del receptor de Fc a los fragmentos Fc de anticuerpo. Por otro lado, en esta realización, conviene evitar usar un anticuerpo cuyo fragmento constante pueda reconocerse por el receptor de Fc de interés.

- El par constituido por la secuencia cisteína-cisteína-X-X-cisteína-cisteína (SEQ ID NO. 1) en la que X es un aminoácido cualquiera y un compuesto de biarsénico. Estos compuestos de biarsénico pueden marcarse fácilmente con una molécula orgánica del tipo fluoresceína o rodamina (véase B. A. Griffin *et al.* (1998) Science. 1998, 281, 269-271 y S.A. Adams *et al.* (2002) J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6063-6076 para detalles sobre la tecnología).

- El péptido BTX (bungarotoxina), compuesto por 13 aminoácidos que se reconoce por la bungarotoxina (BTX), puede acoplarse a una molécula fluorescente (véase C. M. McCann *et al.* (2005), Biotechnique (2005), 38, 945-952).

- El par estreptavidina (o avidina) / biotina: la secuencia de unión de la estreptavidina (SBP-Tag) es una secuencia formada por 38 aminoácidos que presenta una alta afinidad por la biotina que puede marcarse previamente con un donador o un aceptor (véase C. M. McCann *et al.* (2005), Biotechnique (2005), 38, 945-952).

- La secuencia de la enzima dihidrofolato reductasa de *E. coli* (eDHFR) que se une de manera específica y con una alta afinidad a ligandos, tales como la trimetoprima, en los que pueden injertarse el donador o el aceptor según la tecnología denominada "Ligand link Universal labelling technology" (tecnología de marcaje universal de unión a ligandos) de la compañía Active Motif.

- Los pares etiquetas/antietiquetas son parejas de unión frecuentemente usadas para marcar proteínas. El término

“etiqueta” designa una pequeña “etiqueta” proteica constituida por una secuencia de aminoácidos, generalmente, pero no obligatoriamente, bastante corta (menos de 15 aminoácidos), que se fusiona al receptor de Fc. El término “antietiqueta” designa un anticuerpo que se une de manera específica a dicha “etiqueta”. En esta realización, el anticuerpo “antietiqueta” se une de manera covalente al donador o al aceptor. Cuando el anticuerpo así marcado se añade al medio extracelular, se une a la “etiqueta” conjugada al receptor de Fc y la interacción “etiqueta/antietiqueta” permite el marcaje indirecto de esta proteína mediante el donador o el aceptor. A modo de ejemplo no limitativo de pares “etiquetas/antietiquetas”, pueden mencionarse los siguientes pares cuyos miembros están comercialmente disponibles: GST/anticuerpo anti-GST en el que GST representa la glutatión S-transferasa o uno de sus fragmentos; 6HIS/anticuerpo anti-6HIS en el que 6HIS es un péptido constituido por 6 histidinas; Myc/anticuerpo anti-Myc en el que Myc es un péptido constituido por los aminoácidos 410-419 de la proteína Myc humana; FLAG/anticuerpo anti-FLAG en el que FLAG es un péptido que tiene los 8 aminoácidos DYKDDDDK (SEQ ID NO. 2); HA/anticuerpo anti-HA en el que HA es un epítipo de la hemaglutinina de influenza, constituido por los 9 aminoácidos YPYDVPFYA (SEQ ID NO. 3). Queda claro que la naturaleza exacta de la etiqueta no es crítica para la puesta en práctica del procedimiento.

(b) *Acoplamiento del receptor de Fc con un donador o un aceptor de manera covalente, acoplamiento no comprendido en la presente invención*

En este enfoque, el donador o el aceptor se acopla al receptor de Fc mediante una unión covalente; se han descrito varias técnicas y los reactivos necesarios para sus puestas en práctica están comercialmente disponibles. Para este acoplamiento, podrá usarse una de las siguientes técnicas:

- Formación de una unión covalente a nivel de un grupo reactivo presente en el receptor de Fc, en particular a nivel de uno de los siguientes grupos: el grupo amino terminal, los grupos carboxilato de los ácidos aspárticos y glutámicos, los grupos amina de las lisinas, los grupos guanidina de las argininas, los grupos tiol de las cisteínas, los grupos fenol de las tirosinas, los ciclos indol de los triptófanos, los grupos tioéter de las metioninas, los grupos imidazol de las histidinas.

Estos grupos presentes en el receptor de Fc pueden formar una unión covalente con un grupo reactivo portado por el donador o el aceptor. Los grupos reactivos apropiados los conoce el experto en la materia: un donador o el aceptor funcionalizado mediante un grupo maleimida será capaz de, por ejemplo, unirse de manera covalente con los grupos tiol portados por las cisteínas de la proteína. Así mismo, un donador/aceptor que porta un éster de N-hidroxisuccinimida será capaz de fijarse de manera covalente a una amina del receptor de membrana.

(c) *Acoplamiento del receptor de Fc con un donador o un aceptor de manera covalente usando una enzima suicida, acoplamiento según la invención*

Por enzima suicida se entienden proteínas que tienen una actividad enzimática modificada mediante mutaciones específicas que les confieren la capacidad de unirse rápidamente y de manera covalente a un sustrato. Estas enzimas se denominan “suicidas” porque cada una solo puede unirse a una única molécula fluorescente, bloqueándose la actividad de la enzima mediante la fijación del sustrato. Estas enzimas constituyen por consiguiente una herramienta de elección para marcar de manera específica receptores de interés con una razón de una molécula fluorescente con respecto a una proteína. En este enfoque, se fusiona una enzima suicida, mediante las técnicas clásicas de biología molecular, con el receptor de Fc (preferiblemente en su parte N-terminal) y se introduce el sustrato de la enzima unido de manera covalente a un donador/aceptor en el medio extracelular. La reacción enzimática tiene como consecuencia la unión covalente del sustrato marcado a la enzima, y por tanto el marcaje del receptor de Fc mediante el donador o el aceptor.

Pueden mencionarse a modo de ejemplo no limitativo las siguientes enzimas:

- los mutantes de la O⁶-alquilguanina ADN alquiltransferasa (AGT). Las enzimas SNAP-tag (Juillerat *et al*, Chemistry & biology, vol. 10, 313-317, abril de 2003) y CLIP-tag (Gautier *et al*, Chemistry and Biology, 15, 128-136, febrero de 2008) comercializadas por la compañía Cisbio Bioassays son mutantes de la AGT humana cuyos sustratos son, respectivamente, la O⁶-bencilguanina (abreviada en adelante como BG) y la O²-bencilcitosina (abreviada en adelante como BC). La enzima N-AGT (Gronemeyer *et al*. (Protein engineering, design & selection, vol. 19, n.º 7, págs. 309-3016, 2006)) es otro mutante de esta enzima cuya reactividad con la O⁶-bencilguanina es mejor que la de la enzima SNAP-tag.

- los mutantes de una deshalogenasa (tal como la enzima HaloTag comercializada por Promega) que también genera una reacción enzimática del tipo suicida (véase el documento WO2004/072232), de la que algunos de los sustratos son compuestos de la familia de los cloroalcanos, en particular los cloroalcanos que comprenden el motivo -NH-CH₂CH₂-OCH₂CH₂-O-(CH₂)₆-Cl. En este caso, el donador/aceptor se conjugará a este tipo de motivo.

- La proteína ACP (“Acyl Carrier Protein”), proteína portadora de acilo, en la que se transfiere, en presencia de fosfopanteteína transferasa, el residuo 4'-fosfopanteteína de la coenzima A en una serina de la ACP (N. George *et al*, Journal of the American Chemical society 126 (2004) págs. 8896-8897). Cuando se usa este enfoque para

marcar el receptor de Fc mediante el donador o el aceptor, es necesario añadir al medio de reacción fosfopanteteína transferasa. La compañía NEB comercializa un fragmento de la ACP con el nombre comercial "ACP-Tag" para el marcaje de proteínas.

5 Cuando se usa este enfoque para marcar el receptor de interés, las células se transfectan con un plásmido de expresión que comprende el ADN que codifica para una proteína de fusión que comprende la enzima suicida y el receptor de interés. Este plásmido también puede comprender, en sentido del ADN que codifica para estas proteínas, el ADN que codifica para una etiqueta tal como por ejemplo el epítipo FLAG, el epítipo myc o incluso el de la hemaglutinina de influenza (HA). Estas etiquetas no son esenciales, pero facilitan la manipulación de la proteína de fusión con fines de control o de purificación. La transfección se realiza mediante las técnicas clásicas, tales como la electroporación.

15 Para garantizar que la proteína de fusión se expresará en la membrana celular, puede resultar útil incluir en el plásmido de expresión, en sentido de la secuencia que codifica para el receptor de interés y de la enzima suicida, la que codifica para un péptido de direccionamiento a la membrana, tal como el péptido señal T8 o el péptido señal del receptor mGluR5, cuyo uso para este efecto conoce el experto en la materia. Finalmente, también puede ser deseable garantizar que la secuencia que codifica para el receptor de interés no comprende ninguna secuencia de direccionamiento a la membrana nativa que pueda ser objeto de una escisión postraduccional de la unión entre el receptor de interés y la enzima suicida: si es así, es preferible no introducir este dominio en el plásmido de expresión.

25 Finalmente, cuando se usa una enzima suicida para marcar el receptor de Fc con la pareja de FRET, la invención comprende una etapa preliminar de transfección de las células mediante un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN que codifica para una proteína de fusión correspondiente al receptor de Fc, fusionada en su parte N-terminal con una enzima suicida. El experto en la materia conoce las técnicas de transfección tales como la electroporación o el uso de Lipofectamine.

30 La introducción en el medio extracelular del sustrato de la enzima conjugado a una pareja de FRET tendrá como consecuencia el marcaje del receptor de interés mediante esta pareja de FRET.

35 La compañía Cisbio Bioassays comercializa plásmidos Tag-Lite® que permiten la expresión de proteínas de fusión con las enzimas suicidas conocidas con los nombres comerciales de SNAP-tag®, CLIP-tag® y Halotag®. Las secuencias de ADN que codifican para los receptores de Fc de la tabla 1 se conocen y están disponibles en las bases de datos tales como Genbank.

Marcaje del anticuerpo

40 El anticuerpo también puede marcarse de manera directa o indirecta. Según la invención, el anticuerpo se marca de manera directa.

45 El marcaje directo del anticuerpo mediante un compuesto fluorescente puede realizarse mediante los métodos clásicos conocidos por el experto en la materia, que se basan en la presencia de grupos reactivos en el anticuerpo, en particular los siguientes grupos: el grupo amino terminal, los grupos carboxilato de los ácidos aspárticos y glutámicos, los grupos amina de las lisinas, los grupos guanidina de las argininas, los grupos tiol de las cisteínas, los grupos fenol de las tirosinas, los ciclos indol de los triptófanos, los grupos tioéteres de las metioninas, los grupos imidazol de las histidinas.

50 Estos grupos pueden formar una unión covalente con un grupo reactivo portado por el compuesto fluorescente. El experto en la materia conoce los grupos reactivos apropiados: un donador o el aceptor funcionalizado mediante un grupo maleimida será capaz de, por ejemplo, unirse de manera covalente con los grupos tiol portados por las cisteínas de la proteína. Así mismo, un donador/aceptor que porta un éster de N-hidroxisuccinimida será capaz de fijarse de manera covalente a una amina presente en el anticuerpo.

55 Sin estar comprendido en la presente invención, el anticuerpo también puede marcarse mediante un compuesto fluorescente de manera indirecta, por ejemplo, introduciendo en el medio de medición otro anticuerpo, a su vez unido de manera covalente a un compuesto fluorescente, reconociendo este segundo anticuerpo de manera específica el primer anticuerpo. Cuando se usa este enfoque, conviene elegir un anticuerpo secundario cuyo dominio Fc no se reconozca por el receptor de Fc.

60 Sin estar comprendido en la presente invención, otro medio de marcaje indirecto muy clásico consiste en fijar biotina en el anticuerpo que va a marcarse, después incubar este anticuerpo biotinilado en presencia de estreptavidina marcada mediante un fluoróforo. Hay anticuerpos biotinilados disponibles en el comercio y la compañía Cisbio Bioassays comercializa por ejemplo estreptavidina marcada con el fluoróforo cuya denominación comercial es "d2" (ref. 610SADLA).

65 En la medida en que el anticuerpo del que se desea medir la unión al receptor de Fc se une a este receptor

mediante su dominio Fc, sus dominios variables siguen estando disponibles para reconocer el antígeno para el que son específicos. Por tanto, sin que esté comprendido en la presente invención, también es posible marcar el anticuerpo de manera indirecta introduciendo en el medio de medición el antígeno de este anticuerpo, estando este antígeno marcado mediante un compuesto fluorescente.

5

Pares de parejas de FRET

Según la invención, los receptores de Fc y al menos uno de los anticuerpos reconocidos por estos receptores se marcan cada uno mediante un miembro de un par de parejas de FRET, en particular mediante un compuesto fluorescente donador o un compuesto fluorescente aceptor de energía.

10

El FRET se define como una transferencia de energía no radiactiva que resulta de una interacción dipolo-dipolo entre un donador y un aceptor de energía. Este fenómeno físico necesita una compatibilidad energética entre estas moléculas. Esto significa que el espectro de emisión del donador debe recubrir, al menos parcialmente, el espectro de absorción del aceptor. De acuerdo con la teoría de Förster, el FRET es un proceso que depende de la distancia que separa las dos moléculas, donador y aceptor: cuando estas moléculas están en proximidad una de otra, se emitirá una señal de FRET.

15

La selección del par de fluoróforos donador / aceptor para obtener una señal de FRET se encuentra dentro del alcance del experto en la materia. Se describen pares donador-aceptor que pueden usarse para estudiar los fenómenos de FRET concretamente en la obra de Joseph R. Lakowicz (Principles of fluorescence spectroscopy, 2ª edición, 338), a la que podrá remitirse el experto en la materia.

20

Los compuestos fluorescentes donadores de energía de tiempo de vida largo (> 0,1 ms, preferiblemente comprendido entre 0,5 y 6 ms), en particular los quelatos o criptatos de tierras raras, resultan ventajosos ya que permiten efectuar mediciones de resolución temporal, es decir, medir señales de TR-FRET (en inglés, "Time Resolved FRET", "FRET de resolución temporal") desprendiéndose de una gran parte del ruido de fondo emitido por el medio de medición. Por este motivo y de manera general se prefieren para la puesta en práctica del procedimiento según la invención. Ventajosamente, estos compuestos son complejos de lantánidos. Estos complejos (tales como quelatos o criptatos) son particularmente apropiados como miembro del par de FRET donador de energía.

25

30

Los complejos de disprosio (Dy^{3+}), de samario (Sm^{3+}), de neodimio (Nd^{3+}), de iterbio (Yb^{3+}) o incluso de erbio (Er^{3+}) son complejos de tierras raras también apropiados para los fines de la invención, pero se prefieren particularmente los complejos de europio (Eu^{3+}) y de terbio (Tb^{3+}).

35

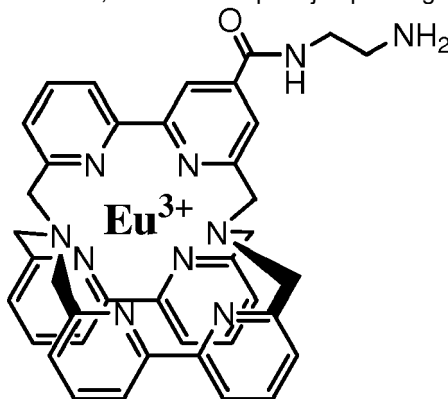
Se han descrito numerosos complejos de tierras raras y varios se comercializan actualmente por las compañías PerkinElmer, Invitrogen y Cisbio Bioassays.

Ejemplos de quelatos o criptatos de tierras raras apropiados para los fines de la invención son:

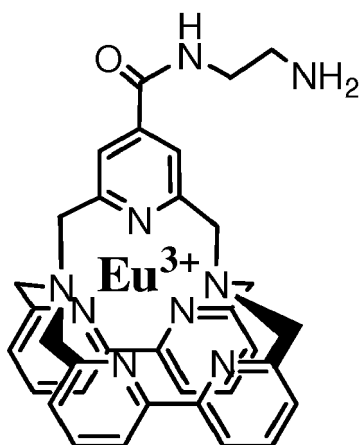
40

• Los criptatos de lantánidos, que comprenden uno o varios motivos de piridina. Tales criptatos de tierras raras se describen por ejemplo en las patentes EP 0 180 492, EP 0 321 353, EP 0 601 113 y en la solicitud internacional WO 01/96 877. Los criptatos de terbio (Tb^{3+}) y de europio (Eu^{3+}) son particularmente apropiados para los fines de la presente invención. Criptatos de lantánidos se comercializan por la compañía Cisbio Bioassays. A modo de ejemplo no limitativo pueden citarse los criptatos de europio de las siguientes fórmulas (que pueden acoplarse al compuesto que va a marcarse mediante un grupo reactivo, en este caso por ejemplo un grupo NH_2):

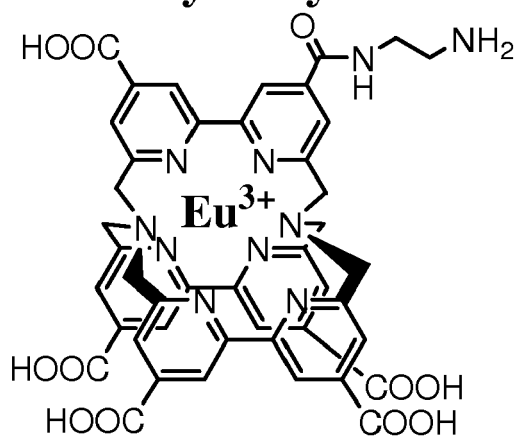
45



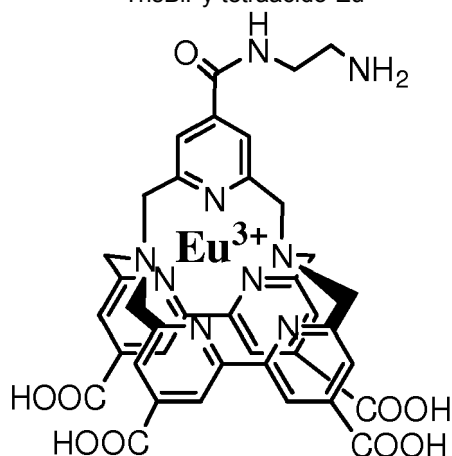
TrisBiPy-Eu



Py-BiPy-Eu



TrisBiPy-tetraácido-Eu



Py-BiPy-tetraácido-Eu

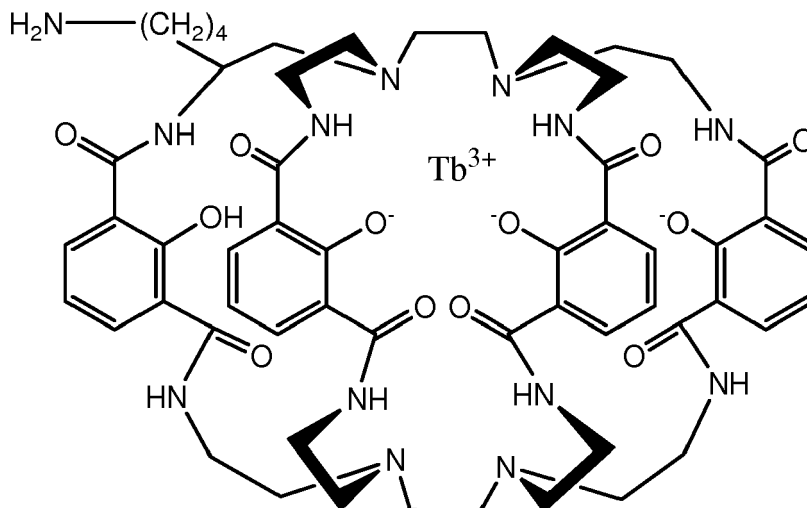
5

10 • Los quelatos de lantánidos descritos concretamente en las patentes US 4 761 481, US 5 032 677, US 5 055 578, US 5 106 957, US 5 116 989, US 4 761 481, US 4 801 722, US 4 794 191, US 4 637 988, US 4 670 572, US 4 837 169, US 4 859 777. Las patentes EP 0 403 593, US 5 324 825, US 5 202 423, US 5 316 909 describen quelatos compuestos por un ligando nonadentado tal como la terpiridina. Quelatos de lantánidos se comercializan por la compañía PerkinElmer.

• También pueden usarse complejos de lantánidos constituidos por un agente quelante, tal como el tetraazaciclododecano, sustituido con un cromóforo que comprende ciclos aromáticos, tales como los descritos por Poole R. *et al.* en *Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1013-1024 "Synthesis and characterisation of highly emissive and kinetically stable lanthanide complexes suitable for usage in cellulose". También pueden usarse los complejos descritos en la solicitud WO 2009/10580.

• También pueden usarse los criptatos de lantánidos descritos en las patentes EP 1 154 991 y EP 1 154 990.

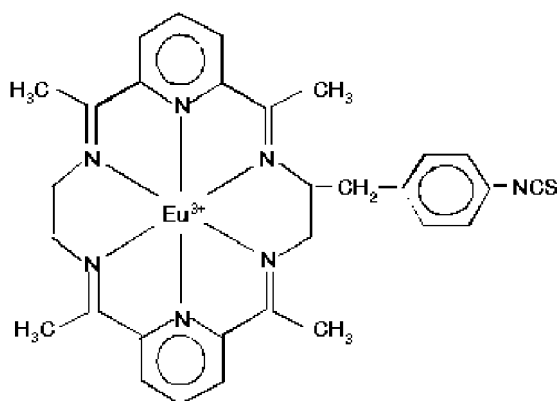
• El criptato de terbio de la siguiente fórmula (que puede acoplarse a un compuesto que va a marcarse mediante un grupo reactivo, en este caso por ejemplo un grupo NH₂):



y cuya síntesis se describe en la solicitud internacional WO 2008/063721 (compuesto 6a, página 89).

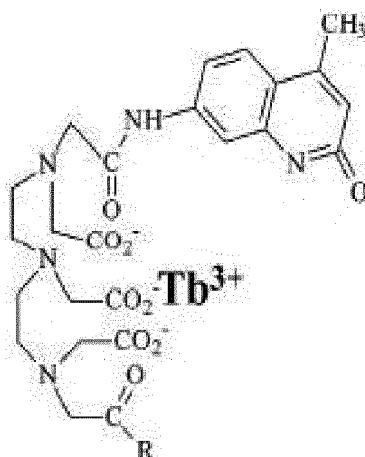
• El criptato de terbio Lumi4-Tb de la compañía Lumiphore, comercializado por Cisbio Bioassays.

• El quantum dye de la compañía Research Organics, de la siguiente fórmula (que puede acoplarse al compuesto que va a marcarse mediante un grupo reactivo, en este caso NCS):

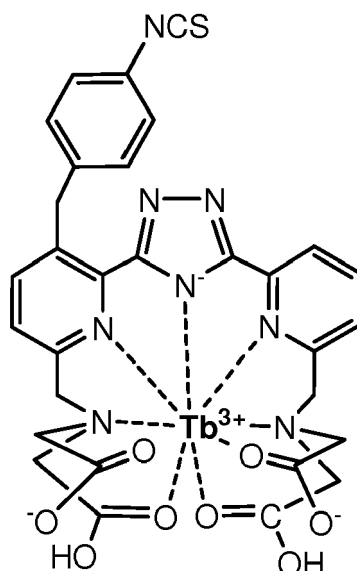


• Los quelatos de rutenio, en particular los complejos constituidos por un ion rutenio y por varias bipyridinas tales como rutenio (II)-tris(2,2'-bipyridina).

• El quelato de terbio DTPA-cs124 Tb, comercializado por la compañía Life technologies de la siguiente fórmula (que puede acoplarse al compuesto que va a marcarse mediante un grupo reactivo R) y cuya síntesis se describe en la patente estadounidense US 5 622 821.



• El quelato de terbio de la siguiente fórmula y descrito por Latva *et al* (Journal of Luminescence 75: 149-169):



5

Tb-W14016

De manera particularmente ventajosa, el compuesto fluorescente donador se elige de: un criptato de europio; un quelato de europio; un quelato de terbio; un criptato de terbio; un quelato de rutenio; y un quantum dye; prefiriéndose particularmente los quelatos y los criptatos de europio y de terbio.

10

Los complejos de disprosio (Dy^{3+}), de samario (Sm^{3+}), de neodimio (Nd^{3+}), de iterbio (Yb^{3+}) o incluso de erbio (Er^{3+}) también son complejos de tierras raras apropiados para los fines de la invención.

15

Los compuestos fluorescentes aceptores pueden elegirse del siguiente grupo: las alofocianinas, en particular las conocidas con la denominación comercial XL665; las moléculas orgánicas luminiscentes, tales como las rodaminas, las cianinas (tales como por ejemplo Cy5), las escuarainas, las cumarinas, las proflavinas, las acridinas, las fluoresceínas, los derivados del boro-dipirrometeno (comercializados con la denominación "Bodipy"), los fluoróforos conocidos con la denominación "Atto", los fluoróforos conocidos con la denominación "DY", los compuestos conocidos con la denominación "Alexa", el nitrobenzoxadiazol. Ventajosamente, los compuestos fluorescentes aceptores se eligen de las alofocianinas, las rodaminas, las cianinas, las escuarainas, las cumarinas, las proflavinas, las acridinas, las fluoresceínas, los derivados del boro-dipirrometeno, el nitrobenzoxadiazol.

20

Las expresiones "las cianinas" y "las rodaminas" deben comprenderse respectivamente como "los derivados de cianina" y "los derivados de rodamina". El experto en la materia conoce estos diferentes fluoróforos, disponibles en el comercio.

25

Los compuestos “Alexa” se comercializan por la compañía Invitrogen; los compuestos “Atto” se comercializan por la compañía Attotec; los compuestos “DY” se comercializan por la compañía Dyomics; los compuestos “Cy” se comercializan por la compañía Amersham Biosciences; los demás compuestos se comercializan por diversos proveedores de reactivos químicos, tales como las compañías Sigma, Aldrich o Acros.

5 También pueden usarse las siguientes proteínas fluorescentes como compuesto fluorescente aceptor: las proteínas fluorescentes cian (AmCyan1, Midori-Ishi Cyan, mTFP1), las proteínas fluorescentes verdes (EGFP, AcGFP, TurboGFP, Emerald, Azami Green, ZsGreen), las proteínas fluorescentes amarillas (EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, PhiYFP, ZsYellow1, mBanana), las proteínas fluorescentes naranjas y rojas (Orange kusibari, mOrange, tdtomato, DsRed, DsRed2, DsRed-Express, DsRed-Monomer, mTangerine, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, mStrawberry, HcRed1, mRaspberry, HcRed-Tandem, mPlim, AQ143), las proteínas fluorescentes en el infrarrojo lejano (mKate, mKate2, tdKatushka2).

10 Para los fines de la invención, se prefieren los derivados de cianinas o de la fluoresceína como compuestos fluorescentes aceptores.

15 Estuche de reactivos, células

20 La descripción también se refiere a vectores de expresión, “kits” o estuches de reactivos para la puesta en práctica de los procedimientos según la invención.

25 Los vectores de expresión según la descripción son plásmidos que permiten la expresión de una proteína de fusión que comprende la secuencia de ADN que codifica para el receptor de Fc de interés y la secuencia que codifica para una enzima suicida, en particular elegida de los mutantes de la deshalogenasa, un fragmento de la proteína de transporte de acilos o los mutantes de la O6-alquilguanina ADN alquiltransferasa, prefiriéndose estos últimos. Pueden obtenerse integrando la secuencia de ADN que codifica para el receptor de Fc de interés en uno de los plásmidos comercializados por la compañía Cisbio Bioassays con las denominaciones Tag-Lite® SNAP-tag®, CLIP-tag® y Halo-tag®.

30 La descripción también se refiere a células, concretamente células de mamíferos, que se han transfectado de manera estable o transitoria con los vectores de expresión según la invención. Las técnicas de introducción de vectores de expresión en las células, tales como la electroporación o incluso el uso de Lipofectamine, las conoce el experto en la materia. En un aspecto particularmente ventajoso, se incuban estas células en presencia del sustrato de la enzima suicida, conjugado a un miembro de un par de parejas de FRET, y de este modo se marca el receptor de Fc que expresan. Estas células pueden condicionarse en forma congelada para facilitar su conservación y su distribución a los usuarios.

35 Los estuches o kits de reactivos según la invención comprenden los vectores de expresión o las células anteriores, acompañados por uno o los dos miembros de un par de parejas de FRET. Estas parejas de FRET pueden conjugarse al sustrato de la enzima suicida, y/o bien conjugarse a un anticuerpo de referencia cuyo fragmento Fc es capaz de unirse a los receptores de Fc expresados por las células.

40 De manera preferida, en los plásmidos y estuches de reactivos anteriores, el receptor de interés es un receptor de Fc gamma y, en particular, es el receptor CD16a o una de sus variantes.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Material y método

50 *Reactivos usados:*

Medio de cultivo: DMEM/Glutamax + SVF al 10% + estreptomycin (50 µg/ml), penicilina 50 U/ml, HEPES 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen)

55 *OptiMEM:* medio de cultivo usado para la transfección, Invitrogen

Lipofectamine 2000: Invitrogen

60 *Plásmido SNAP-CD16A:* preparado insertando la secuencia nucleica (SEQ ID NO. 4) que codifica para el receptor CD16A (variante V158 (o V176) ref. Genbank NM_000569.6, secuencia proteica NP_000560.5) en el plásmido SNAP-tag® pT8-SNAP-neomicina (Cisbio Bioassays), véase la figura 1.

65 *Plásmido de cadena gamma del receptor de FcεRI:* La secuencia de ADN (SEQ ID NO. 5) que codifica para la cadena gamma del receptor de FcεRI se insertó en un plásmido de expresión mediante las técnicas clásicas. El esquema de este plásmido se representa en la figura 2. Se sabe que el receptor CD16a forma dímeros con esta cadena gamma, y por tanto se aconseja expresar conjuntamente las dos proteínas. No obstante, los inventores han

descubierto que esta expresión conjunta no era necesaria para poner en práctica el procedimiento según la invención.

SVF: suero de ternero fetal, Invitrogen

DMSO: Dimetilsulfóxido, SIGMA

Tag-Lite® SNAP-Lumi4Tb: Compuesto donador, Cisbio Bioassays, ref. SSNPTBX

Tag-Lite®: tampón de marcaje, Cisbio Bioassays, ref. LABMED.

Transfección de las células:

Se incubaron una mezcla de transfección que contenía 5 μ l de plásmido "SNAP-CD16A" (1 μ g/ μ l), 15 μ l de Lipofectamine y 2,6 ml de medio OptiMEM y una mezcla de 10 μ l de plásmido de "cadena gamma" (1 μ g/ μ l), 30 μ l de Lipofectamine y 5,4 ml de medio OptiMEM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se pusieron células HEK293 en cultivo en un matraz T175. Una vez que estas células alcanzaron una confluencia del 60 al 70%, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 10 ml de medio PBS. A continuación, se añadieron 8 ml de la mezcla de transfección a estas células, así como 12 ml de medio de cultivo. A continuación, se incubaron las células durante 1 noche a 37°C.

Marcaje con el compuesto fluorescente donador Lumi4® Tb

Tras la retirada de la mezcla de transfección y el lavado con 10 ml de PBS, se añadieron 10 ml de compuesto fluorescente donador Tag-Lite® SNAP-Lumi4-Tb (100 nM) en disolución en el tampón de marcaje Tag-Lite®.

Tras la incubación de 1 h a 37°C, se lavó la mezcla 4 veces con el tampón de marcaje Tag-Lite®, después se añadieron 5 ml de tampón "cell dissociation buffer" (tampón de disociación celular) (Sigma) para disociar las células y 5 ml de medio OptiMEM. Se centrifugaron las células así obtenidas durante 5 min a 1200 rpm. A continuación, se resuspendió el residuo con 1 ml + 1 ml de tampón de marcaje Tag-Lite® con el fin de poder contar las células.

Volvió a centrifugarse esta suspensión 5 min a 1200 rpm y se llevó el residuo al medio de cultivo que contenía SVF al 10% y DMSO al 10% para obtener una suspensión de células marcadas a la concentración de 1 millón de células / ml.

Se extrajeron alícuotas de esta suspensión en tubos a razón de 1 ml por tubo, y se colocaron los tubos en una caja Nalgene a -80°C.

Medición de las señales de FRET

En los siguientes ejemplos, se midieron las señales de FRET de resolución temporal en un aparato compatible con HTRF, el PHERAstarFS (BMG Labtech) con un retardo de 60 μ s y un tiempo de integración de 400 μ s.

Ejemplo 2

Se descongelaron a 37°C las células preparadas según el método descrito en el ejemplo 1 y se mezclaron rápidamente con 15 ml de PBS. Se centrifugó la suspensión obtenida 5 min a 1200 rpm y se retiró el sobrenadante. Volvió a suspenderse el residuo en tampón Tag-Lite® para obtener una suspensión que permitía la distribución de células HEK-CD16a-Tb en pocillos de una placa de múltiples pocillos 384 LV a la concentración de 10.000 células por pocillo en 10 μ l.

Se añadió un anticuerpo humano de isotipo IgG1 (no importa su especificidad epitópica) no marcado a diferentes concentraciones finales de 0,3 nM a 5 μ M en 5 μ l.

Se añadió el mismo anticuerpo, marcado mediante el fluoróforo aceptor d2 (kit de marcaje d2 Cisbio Bioassays, ref. 62D2DPEA), a 200 nM en 5 μ l para una concentración final de 50 nM.

Se midieron inmediatamente las señales de FRET emitidas por la placa 384, después tras 30 min, 1 h, 2 h 30, 3 h 40, 5 h y 6 h.

Los resultados presentados en la figura 3 muestran que el procedimiento según la invención permite realizar un seguimiento eficaz de la cinética de unión del fragmento Fc de un anticuerpo a los receptores CD16a.

Ejemplo 3

Se repitió el ejemplo 2 pero esta vez se sustituyó el anticuerpo IgG1 no marcado (anticuerpo competidor) por anticuerpos humanos de isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 (no importan sus especificidades epitópicas) de los que se sabe que no tienen una afinidad por el receptor CD16a tan buena como los anticuerpos de tipo IgG1. Tras la adición de diferentes concentraciones de estos anticuerpos, se incubó el medio de reacción durante 4 h 20.

Los resultados presentados en la figura 4 confirman lo que se sabía en cuanto a la afinidad de las IgG2, IgG3 e IgG4 por el receptor CD16a y por tanto validan el procedimiento según la invención, que permite comparar eficazmente un anticuerpo de referencia con otros anticuerpos y que es lo suficientemente sensible como para permitir visualizar diferencias de afinidad de estos anticuerpos, en este caso por el receptor CD16a.

Ejemplo 4

Se repitió el ejemplo 2 pero esta vez se sustituyó el anticuerpo IgG1 no marcado (anticuerpo competidor) por diferentes anticuerpos de la misma subclase: Herceptin, Pertuzumab y un anticuerpo de ratón anti-EGFR (ATCC528).

Los resultados presentados en la figura 5 confirman que el procedimiento según la invención puesto en práctica con el receptor CD16a permite distinguir un anticuerpo de ratón, que no se fija a CD16a, de otros anticuerpos IgG1 humanos, y es lo suficientemente sensible como para permitir determinar diferencias de afinidad entre varios anticuerpos de clase IgG1.

Ejemplo 5

Se descongelaron a 37°C las células preparadas según el método descrito en el ejemplo 1 y se mezclaron rápidamente con 15 ml de PBS. Se centrifugó la suspensión obtenida 5 min a 1200 rpm y se retiró el sobrenadante. Volvió a suspenderse el residuo en tampón Tag-Lite® para obtener una suspensión que permitía la distribución de células HEK-CD16a-Tb en los pocillos de una placa de múltiples pocillos 384 LV a la concentración de 10.000 células por pocillo en 10 µl.

Se añadió un anticuerpo IgG1 humano marcado en cada pocillo a diferentes concentraciones para una concentración final de 1,5 a 300 nM, en 5 µl.

Para medir el impacto de la fijación no específica del anticuerpo marcado sobre las células, también se añadió el anticuerpo IgG1 no marcado a una concentración final de 3 µM en 5 µl, sustituyéndose este volumen por tampón Tag-Lite® para obtener la señal global.

La señal específica se obtiene mediante sustracción de la señal no específica a la señal global.

Se midieron las señales de FRET emitidas por la placa 384 a diferentes tiempos, presentándose los resultados tras 20 h de incubación en la figura 6.

Este ejemplo muestra que el procedimiento según la invención permite determinar la constante de disociación del complejo IgG1 - CD16a en células vivas, y con un ruido de fondo muy reducido.

Ejemplo 6: Fucosilación

Se repitió el ejemplo 2 pero esta vez se sustituyó el anticuerpo IgG1 no marcado por diferentes anticuerpos que habían sido objeto de un tratamiento destinado a eliminar los residuos de fucosa (Ab1 que se ha sometido a una defucosilación del 4%, Ab2 que se ha sometido a una defucosilación del 8%, Ab3 que se ha sometido a una defucosilación del 57, Ab4 que se ha sometido a una defucosilación del 11%, Ab5 que se ha sometido a una defucosilación del 80%).

Tras la adición de diferentes concentraciones de estos anticuerpos, se incubó el medio de reacción durante 3 h 30 y se leyó la placa en el instrumento Artemis 101 (Berthold technologies) en modo HTRF®.

Se sabe que la defucosilación tiene el efecto de aumentar la afinidad de los anticuerpos por el receptor CD16a, y este resultado se confirma por la figura 7, que también muestra que la invención permite evaluar de manera relativamente sencilla el nivel de fucosilación de anticuerpos de interés a partir de los resultados obtenidos con anticuerpos cuyo nivel de fucosilación se conoce. Por otro lado, este ejemplo también muestra que el procedimiento según la invención es lo suficientemente sensible y permite determinar diferencias de afinidad entre anticuerpos que se han sometido a diversos grados de defucosilación.

Lista de secuencias

<110> Cisbio Bioassays

ES 2 711 767 T3

<120> Procedimiento de determinación de la glicosilación de un anticuerpo
<130> 1H305110 0004 WO
5 <150> Documento FR1158245
<151> 16-09-2011
<160> 5
10 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
15 <211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial
20 <220>
<223> pareja de unión
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
<400> 1
35 Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys
1 5
<210> 2
<211> 8
40 <212> PRT
<213> secuencia artificial
45 <220>
<223> par etiqueta/antietiqueta
<400> 2
50 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 3
55 <211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial
60 <220>
<223> par etiqueta/antietiqueta

<400> 3

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Phe Tyr Ala
 1 5

5 <210> 4

<211> 6758

<212> ADN

10

<213> secuencia artificial

<220>

15

<223> plásmido

<220>

<221> promotor

20

<222> (232)..(819)

<223> promotor de CMV

25

<220>

<221> sig_peptide

<222> (923)..(986)

30

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1004)..(1027)

<223> etiqueta QC

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (1046)..(1591)

45

<223> etiqueta Snap

<220>

<221> gen

50

<222> (1610)..(2321)

<223> gen de interés

55

<220>

<221> sitio de poliA

<222> (2358)..(2582)

60

<223> BGH poliA

<220>

65

<221> misc_feature

ES 2 711 767 T3

<222> (3466)..(4260)

<223> Neo R

5 <220>

<221> misc_feature

10 <222> (5762)..(6622)

<223> Amp R

<400> 4

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
15 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780

ES 2 711 767 T3

gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttaaactt aagctttgag acatggcctt accagtgacc gccttgctcc tgccgctggc 960
 cttgctgctc cacgccgcca ggccggccgc cgctagcggc atcgactaca aggacgacga 1020
 tgacaaggcc ggcacgatg ccatcatgga caaagactgc gaaatgaagc gcaccacct 1080
 ggatagccct ctgggcaagc tggaaactgtc tgggtgcgaa cagggcctgc acgagatcaa 1140
 gctgctgggc aaaggaacat ctgccgccga cgccgtggaa gtgcctgccc cagccgccgt 1200
 gctgggcgga ccagagccac tgatgcaggc caccgcctgg ctcaacgcct actttcacca 1260
 gcctgaggcc atcgaggagt tccctgtgcc agccctgcac caccagtggt tccagcagga 1320
 gagctttacc cgccaggtgc tgtggaaact gctgaaagt gtgaagtctg gagaggtcat 1380
 cagctaccag cagctggccg ccctggccgg caatcccgcc gccaccgccg ccgtgaaaac 1440
 cgccctgagc ggaaatcccg tgcccattct gatcccctgc caccgggtgg tgtctagctc 1500
 tggcgccgtg gggggctacg agggcgggct cgccgtgaaa gagtggctgc tggcccacga 1560
 gggccacaga ctgggcaagc ctgggctggg tgatatccag cacagtggcg gccgcaaga 1620
 tctcccaaag gctgtggtgt tcctggagcc tcaatggtac agggtgctcg agaaggacag 1680
 tgtgactctg aagtgccagg gagcctactc ccctgaggac aattccacac agtggtttca 1740
 caatgagagc ctcatctcaa gccaggcctc gagctacttc attgacgctg ccacagtcga 1800
 cgacagtgga gagtacaggt gccagacaaa cctctccacc ctcagtgacc cgggtgcagct 1860
 agaagtccat atcggctggc tgttgctcca ggccctcgg tgggtgttca aggaggaaga 1920
 ccctattcac ctgaggtgtc acagctggaa gaacactgct ctgcataagg tcacatattt 1980
 acagaatggc aaaggcagga agtattttca tcataattct gacttctaca ttccaaaagc 2040
 cacactcaa gacagcggct cctacttctg cagggggctt gtcgggagta aaaatgtgtc 2100
 ttcagagact gtgaacatca ccatcactca aggtttggca gtgtcaacca tctcatcatt 2160
 ctttccacct gggtagcaag tctctttctg cttggtgatg gtactccttt ttgcagtgga 2220
 cacaggacta tatttctctg tgaagacaaa cattcgaagc tcaacaagag actggaagga 2280
 ccataaattt aaatggagaa aggaccctca agacaaatga tctagagggc ccgtttaaac 2340
 ccgctgatca gcctcgactg tgcccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc 2400
 cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga 2460
 aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggtgggg tggggcagga 2520
 cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggtctat 2580
 ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag 2640
 cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag 2700
 cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctgcccacgt tcgcccggctt 2760
 tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 2820
 cctcgacccc aaaaaacttg attaggtgga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata 2880

ES 2 711 767 T3

gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca 2940
aactggaaca aactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttgcc 3000
gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt 3060
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 3120
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 3180
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 3240
actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 3300
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag 3360
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata 3420
tccatttttc gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 3480
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 3540
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcccgcg 3600
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 3660
cggctatcgt ggctggccac gacgggctt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact 3720
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 3780
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 3840
cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 3900
actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 3960
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 4020
gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 4080
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 4140
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 4200
atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttttga 4260
gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt 4320
tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg 4380
gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcggccac cccaacttgt 4440
ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag 4500
catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 4560
tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggatcatag ctgtttcctg 4620
tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta 4680
aagcctgggg tgcctaataa gtgagctaac tcacattaat tgcggttgcgc tcaactgccc 4740
ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga 4800
gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg 4860
tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 4920

ES 2 711 767 T3

aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 4980
gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 5040
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 5100
ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc 5160
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc 5220
tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc 5280
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 5340
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg taggagcgtg 5400
ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg 5460
tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 5520
aacaaccac cgctggtagc ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 5580
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 5640
actcacgta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 5700
taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca 5760
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 5820
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 5880
ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 5940
accagccagc cgggaaggcc gagcgagaa gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc 6000
agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 6060
acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat 6120
tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag 6180
cggtagctc ctccggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 6240
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 6300
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 6360
gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 6420
tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat 6480
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 6540
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga 6600
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 6660
gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 6720
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgctc 6758

<210> 5

5 <211> 5845

<212> ADN

<213> secuencia artificial
<220>
5 <223> plásmido
<220>
<221> promotor
10 <222> (232)..(819)
<223> promotor de CMV
15 <220>
<221> gen
<222> (965)..(1229)
20 <220>
<221> sitio de poliA
25 <222> (1272)..(1496)
<223> BGH poliA
<220>
30 <221> misc_feature
<222> (2363)..(3388)
35 <223> Hygro R
<220>
<221> misc_feature
40 <222> (4849)..(5709)
<223> Amp R
45 <400> 5

ES 2 711 767 T3

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtccat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc	960
agatatcatg attccagcag tggctttgct cttactcctt ttggttgaac aagcagcggc	1020
cctgggagag cctcagctct gctatatect ggatgccatc ctgtttctgt atggaattgt	1080
cctcacctc ctctactgtc gactgaagat ccaagtgcga aaggcagcta taaccagcta	1140
tgagaaatca gatggtgttt acacgggctt gagcaccagg aaccaggaga cttacgagac	1200
tctgaagcat gagaaaccac cacagtagct cgagtctaga gggcccgttt aaaccgctg	1260

ES 2 711 767 T3

atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgcccct cccccgtgcc 1320
 ttccttgacc ctggaagggt ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc 1380
 atcgcattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa 1440
 gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc 1500
 tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc cacgcgccct gtagcggcgc 1560
 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct 1620
 agcgcgccgt ctttcgctt tcttccttc ctttctcgc acgttcgccc gctttccccg 1680
 tcaagctcta aatcggggca tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga 1740
 ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 1800
 ttttcgccct ttgacgttg agtccacggt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 1860
 aacaacactc aaccctatct cggctctattc ttttgattta taagggattt tggggatttc 1920
 ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg 1980
 aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc caggcaggca gaagtatgca 2040
 aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg 2100
 cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc 2160
 gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat 2220
 tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg 2280
 aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat 2340
 tttcggatct gatcagcacg tgatgaaaaa gcctgaactc accgcgacgt ctgtcgagaa 2400
 gtttctgatc gaaaagttcg acagcgtctc cgacctgatg cagctctcgg agggcgaaga 2460
 atctcgtgct ttcagcttcg atglaggagg gcgtggatat gtcctgcggg taaatagctg 2520
 cgccgatggt ttctacaaag atcgttatgt ttatcggcac tttgcatcgg ccgcgctccc 2580
 gattccggaa gtgcttgaca ttggggaatt cagcgagagc ctgacctatt gcatctcccg 2640
 ccgtgcacag ggtgtcacgt tgcaagacct gcctgaaacc gaactgcccg ctgttctgca 2700
 gccggtcgcg gaggccatgg atgcgatcgc tgcggccgat cttagccaga cgagcgggtt 2760
 cggcccattc ggaccgcaag gaatcgggtca atacactaca tggcgtgatt tcatatgcgc 2820
 gattgctgat ccccatgtgt atcactggca aactgtgatg gacgacaccg tcagtgcgctc 2880
 cgtcgcgcag gctctcgatg agctgatgct ttgggccgag gactgccccg aagtccggca 2940
 cctcgtgcac gcggatttcg gctccaacaa tgtcctgacg gacaatggcc gcataacagc 3000
 ggtcattgac tggagcgagg cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt 3060
 cttctggagg ccgtggttgg cttgtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca 3120
 tccggagctt gcaggatcgc cgcggtccg ggcgtatatg ctccgattg gtcttgacca 3180
 actctatcag agcttgggtg acggcaattt cgatgatgca gcttgggccc agggctgatg 3240
 cgacgcaatc gtccgatccg gagccgggac tgtcgggctg acacaaatcg cccgcagaag 3300

ES 2 711 767 T3

cgcgccgctc tggaccgatg gctgtgtaga agtactcgcc gatagtggaa accgacgccc 3360
 cagcactcgt ccgagggcaa aggaatagca cgtgctacga gatttcgatt ccaccgccc 3420
 cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 3480
 gcgccccgat ctcatgctgg agttcttcgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa 3540
 tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 3600
 ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac 3660
 ctctagctag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 3720
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 3780
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3840
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3900
 tgggcgctct tccgcttccct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 3960
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4020
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 4080
 gctggcgctt tccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4140
 tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttccc ctggaagctc 4200
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 4260
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgaggt 4320
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 4380
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 4440
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 4500
 gtggtgccct aactacggct aactagaag gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa 4560
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 4620
 tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 4680
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 4740
 gatcttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 4800
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 4860
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 4920
 ccccgctgtag tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 4980
 gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5040
 aaggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5100
 ttgccccgaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcaaacg ttgttgcctat 5160
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 5220
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgctc aaaaaagcgg ttagctcctt 5280
 cggctcctcc atcgttgctc gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 5340
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 5400

ES 2 711 767 T3

gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc	5460
gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa	5520
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta	5580
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg	5640
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg	5700
aataactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt ttcaggggtt attgtctcat	5760
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt	5820
tccccgaaaa gtgccacctg acgtc	5845

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* de determinación de la unión de un anticuerpo competidor con un receptor de Fc expresado en membranas celulares o células intactas presentes en un medio de medición, mediante competencia con un anticuerpo de referencia, que comprende las siguientes etapas:
- (i) marcaje directo de dicho receptor de Fc mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET, o bien introducción en el medio de membranas celulares o de células intactas cuyos receptores de Fc se han marcado previamente de manera directa mediante el primer miembro de un par de parejas de FRET;
- (ii) adición en el medio de medición del anticuerpo competidor;
- (iii) adición en el medio de medición de un anticuerpo de referencia, marcado de manera directa mediante el segundo miembro de dicho par de parejas de FRET;
- (iv) medición de la señal de FRET, siendo una disminución de la señal medida en presencia del anticuerpo competidor con respecto a la medida en su ausencia representativa de la unión de este anticuerpo al receptor de Fc;
- caracterizado porque el receptor de Fc se marca de manera directa mediante una enzima suicida, a saber, que se expresa en forma de una proteína de fusión que comprende el receptor de Fc y la enzima suicida, y que el marcaje se realiza mediante adición al medio de medición del sustrato de la enzima, conjugado a una de las parejas de FRET.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se repite la etapa (ii) con diferentes cantidades de anticuerpo competidor, siendo fija la cantidad de anticuerpo de referencia añadido a la etapa (iii), y porque comprende una etapa adicional (v) de determinación de la CE50 del anticuerpo competidor y de comparación con la CE50 del anticuerpo de referencia.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el anticuerpo de referencia y el anticuerpo competidor difieren concretamente en que este último se ha preparado según un procedimiento, o bien ha sido objeto de un tratamiento, destinado a alterar el nivel de glicosilación de su fragmento Fc.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el anticuerpo de referencia y el anticuerpo que va a someterse a prueba difieren concretamente en que este último se ha preparado según un procedimiento, o bien ha sido objeto de un tratamiento, destinado a alterar el nivel de fucosilación de su fragmento Fc.
5. Procedimiento de determinación del nivel de glicosilación de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- puesta en práctica del procedimiento según la reivindicación 2 usando en la etapa (ii) varios anticuerpos competidores que tienen niveles conocidos de glicosilación o de desglicosilación, después
 - puesta en práctica del procedimiento según la reivindicación 2 usando en la etapa (ii) el anticuerpo del que se desea determinar el nivel de glicosilación, y
 - determinación del nivel de glicosilación del anticuerpo estudiado mediante comparación de su CE50 con la de los anticuerpos competidores cuyos los niveles de glicosilación o de desglicosilación se conocen.
6. Procedimiento de determinación del nivel de fucosilación de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- puesta en práctica del procedimiento según la reivindicación 2 usando en la etapa (ii) varios anticuerpos competidores que tienen niveles conocidos de fucosilación o de defucosilación, después
 - puesta en práctica del procedimiento según la reivindicación 4 usando en la etapa (ii) un anticuerpo del que se desea determinar el nivel de fucosilación o de defucosilación, y
 - determinación del nivel de fucosilación del anticuerpo estudiado mediante comparación de su CE50 con la de los anticuerpos competidores cuyos los niveles de fucosilación o de defucosilación se conocen.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el receptor de Fc es un receptor de Fc gamma.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el receptor de

Fc es el receptor CD16a o una de sus variantes.

- 5 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la enzima suicida se elige de: los mutantes de la O6-alquilguanina ADN alquiltransferasa, los mutantes de la deshalogenasa, o un fragmento de la proteína de transporte de acilos.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se pone en práctica con células intactas.
- 10 11. Kits de reactivos para la puesta en práctica del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizados porque comprenden un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN que codifica para un receptor de Fc y la secuencia de ADN que codifica para una enzima suicida o bien células que comprenden dicho vector de expresión, así como al menos un miembro de un par de parejas de FRET.
- 15 12. Kits de reactivos según la reivindicación 11, caracterizados porque la enzima suicida se elige de los mutantes de la deshalogenasa, un fragmento de la proteína de transporte de acilos o los mutantes de la O6-alquilguanina ADN alquiltransferasa.
- 20 13. Kits de reactivos según la reivindicación 11 ó 12, caracterizados porque el receptor de Fc es el receptor CD16a.
- 25 14. Kits de reactivos según una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizados porque las células están en forma congelada.

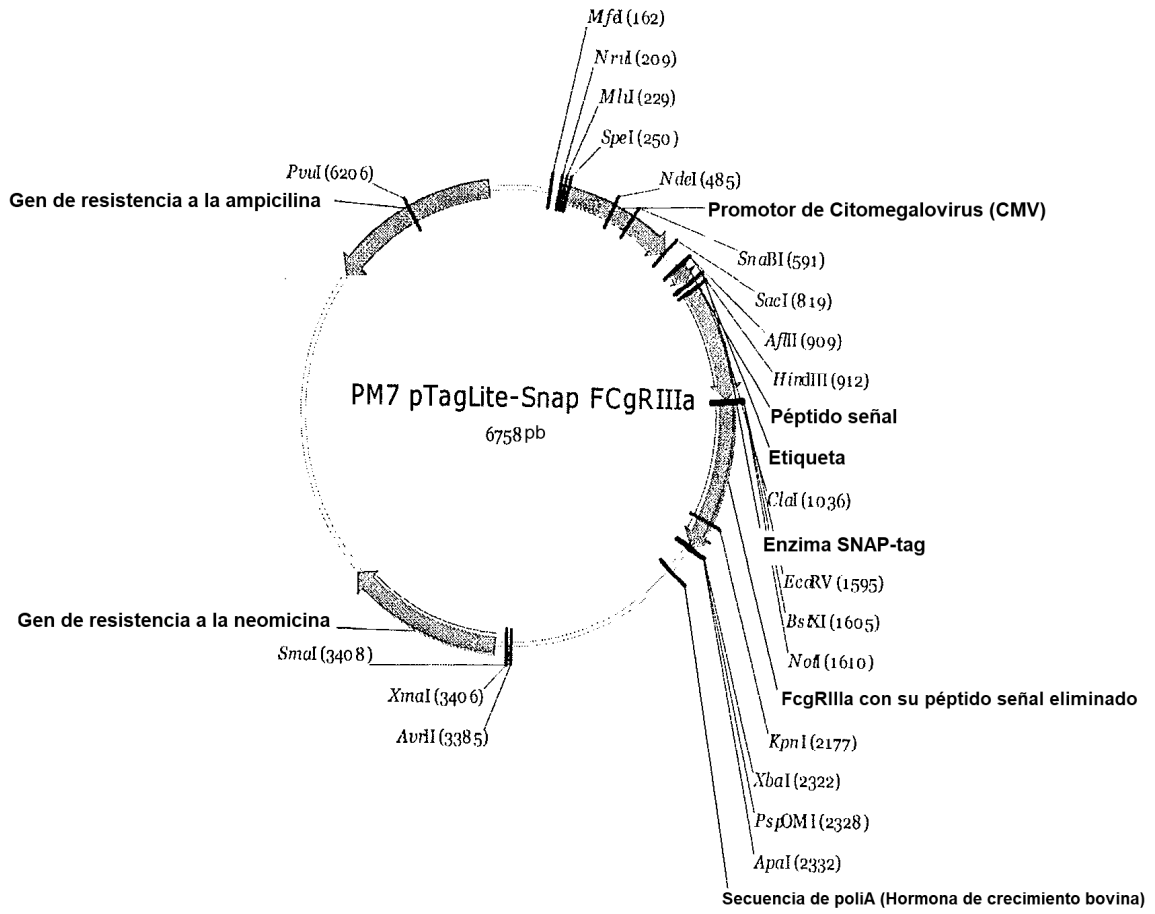


FIG.1

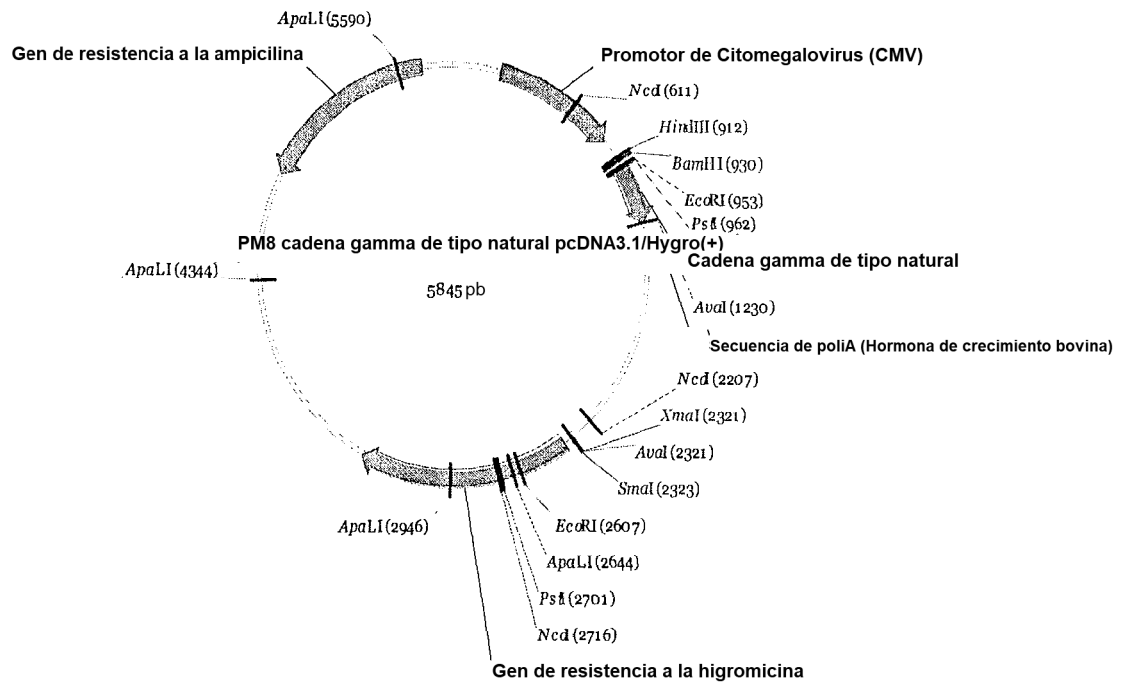


FIG.2

Unión del fragmento Fc al CD16a: cinética de detección

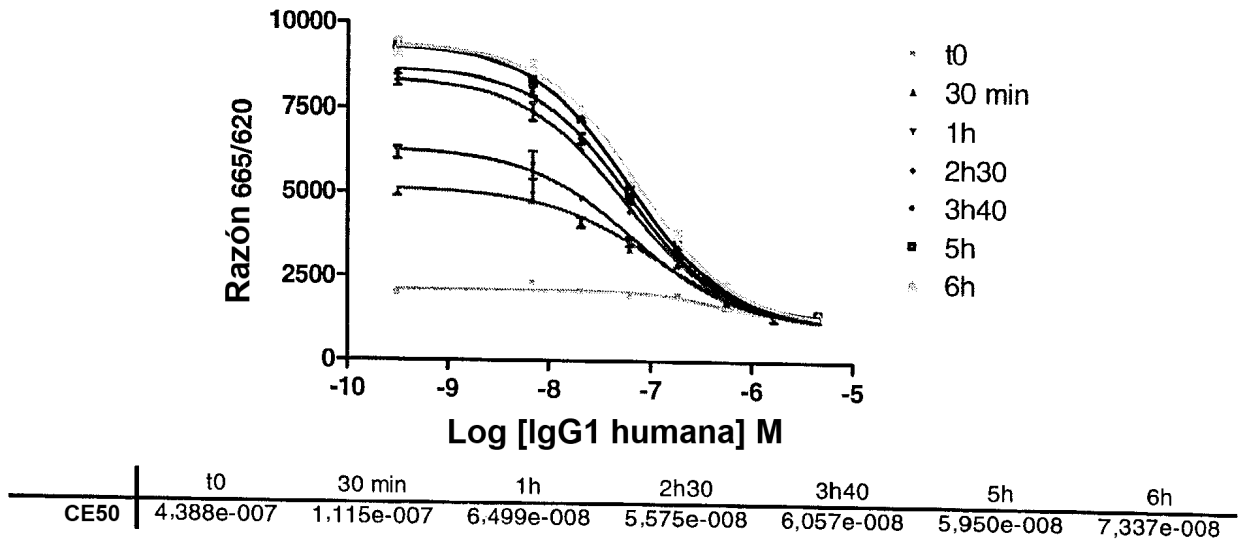


FIG.3

Unión del fragmento Fc al CD16a para diferentes isotipos

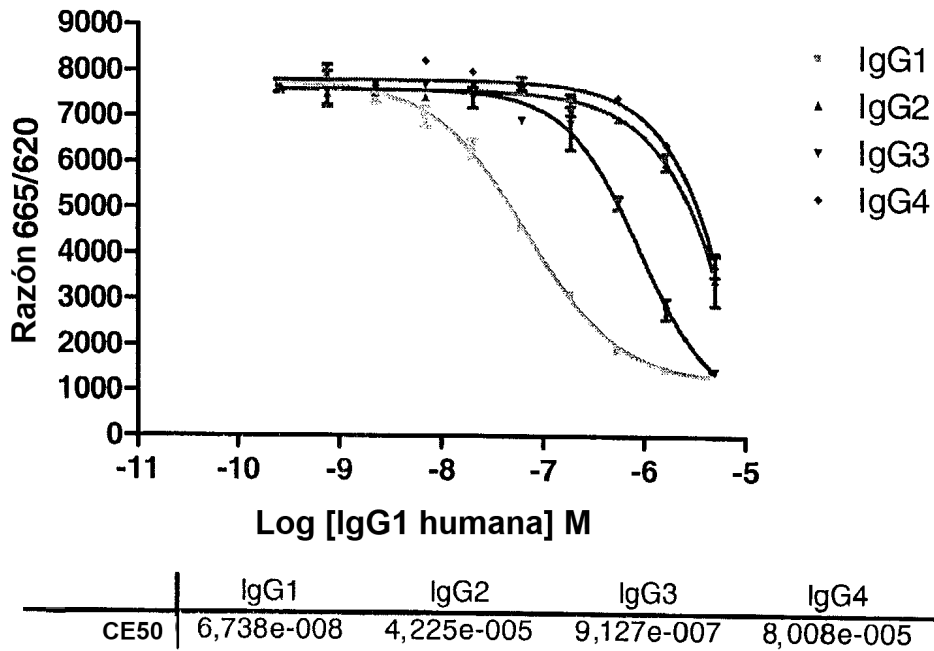


FIG.4

Unión del fragmento Fc al CD16a con diferentes IgG1

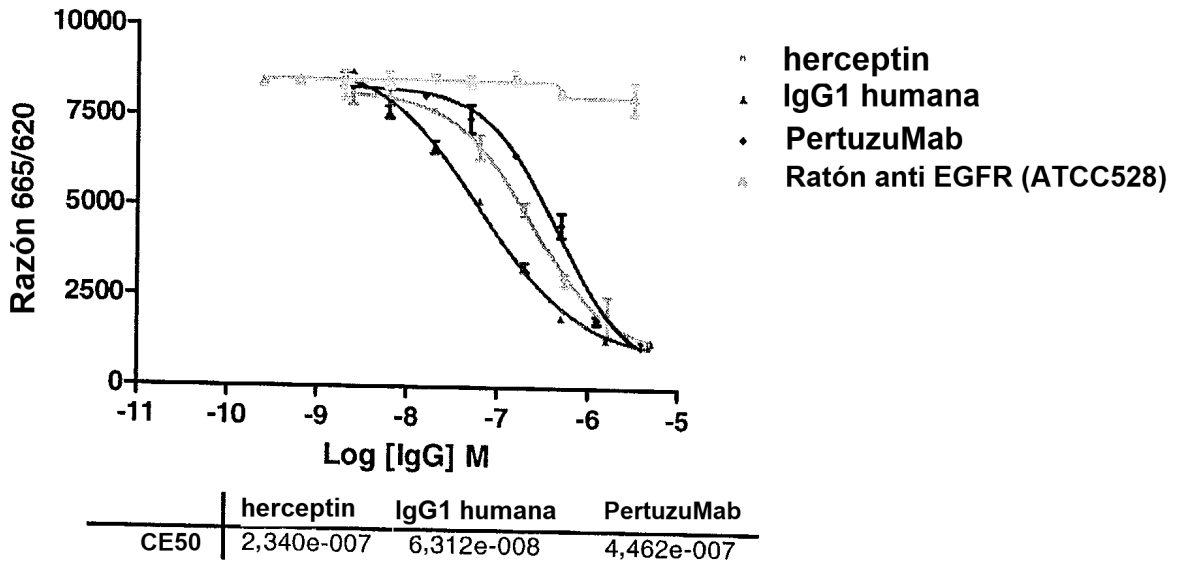


FIG.5

Determinación de Kd

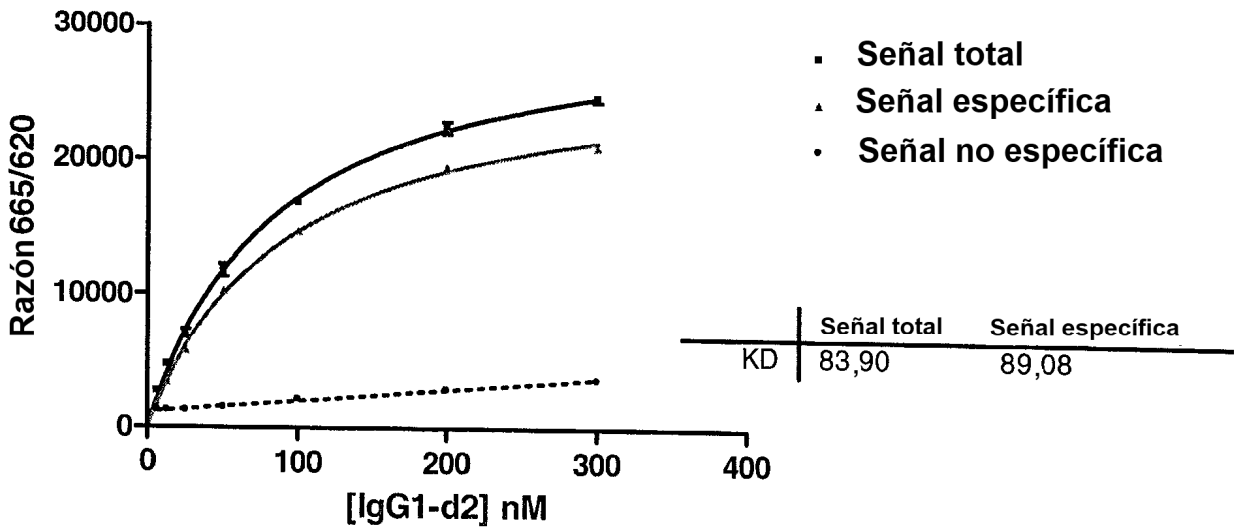
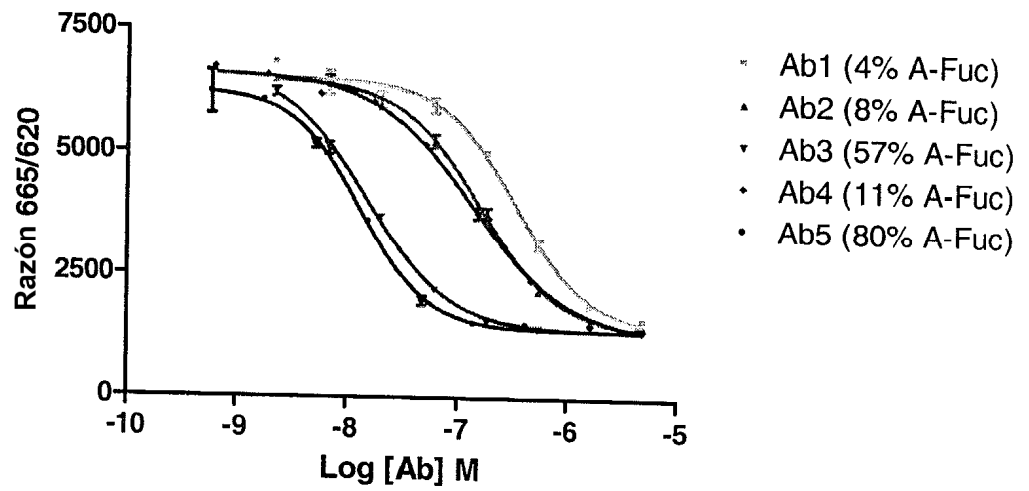


FIG.6

Afinidad de Fc por CD16a en función del grado de fucosilación del Ab



	LOGCE50
Ab1 (4% A-Fuc)	-6,467
Ab2 (8% A-Fuc)	-6,796
Ab3 (57% A-Fuc)	-7,817
Ab4 (11% A-Fuc)	-6,866
Ab5 (80% A-Fuc)	-7,876

FIG.7