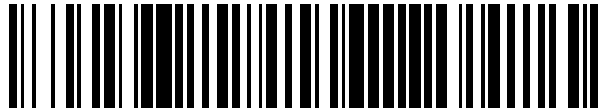


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 557**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/66 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2016 PCT/FR2016/050458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16139415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2016 E 16714989 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3265579**

54 Título: **Procedimiento no radioactivo de determinación de la acción citolítica de un agente frente a células diana, su utilización y su kit asociado**

30 Prioridad:

05.03.2015 FR 1551835
28.07.2015 FR 1557175

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

04.06.2019

73 Titular/es:

CLEAN CELLS (100.0%)
Parc d'Activité Vendée Sud Loire
85600 Bouffere, FR

72 Inventor/es:

BONNAUDET, VÉRONIQUE;
BRETAUDEAU, LAURENT y
ROSSIGNOL, ALEXIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 715 557 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 no radioactivo de determinación de la acción citolítica de un agente frente a células diana, su utilización y su kit asociado

5 La presente invención se refiere al campo de la medición de la muerte celular y más particular a un procedimiento de determinación de la acción citolítica de sustancias activas frente a células diana y/o de un medio que rodea dichas células diana.

10 En el campo industrial, la reglamentación impone caracterizar de manera lo más completa posible cualquier fenómeno o producto que pueda tener consecuencias sobre la salud de las poblaciones humanas o animales. En el amplio marco de la elaboración de ensayos que miden la muerte celular, denominados ensayos de citotoxicidad, estos fenómenos o productos pueden agrupar fenómenos medioambientales, tales como una exposición a una fuente de irradiación o de polución, productos químicos o biológicos no destinados a la salud o también productos con carácter terapéutico.

15 Es en el campo de las sustancias biológicamente activas y más específicamente en el ámbito de sustancias con destino terapéutico, en donde las obligaciones de caracterización son de mayor alcance. Uno de los principales criterios a caracterizar es el de la actividad biológica, denominado también "potencia". En efecto, según la definición reglamentaria de la agencia europea de medicina (CHMP/BWP/157653/2007), la "potencia" es la medición cuantitativa de una actividad biológica basada en un atributo del producto farmacéutico relacionado con una propiedad biológica pertinente de este, debiendo esta medición reflejar su actividad biológica en la situación clínica para la cual se diseña el producto. Según la reglamentación, un ensayo de "potencia" debe por lo tanto basarse en la medición directa de la función biológica esperada del producto ensayado, coherente con su modo de acción conocido o supuesto. En otras palabras, y en el caso de un producto cuyo objetivo es causar la muerte de una población celular dada (la muerte de células tumorales en el caso de un tratamiento anti-canceroso, por ejemplo), un ensayo de citotoxicidad debe basarse en la medición directa de la muerte de la población celular diana. De la misma manera, la elaboración de un ensayo que busca la ausencia (o la existencia) de efectos citotóxicos sobre un producto no destinado a un uso terapéutico debe también basarse en un método que detecte específicamente la muerte de las células diana.

20 En el caso de los medicamentos biológicos, en particular el de los anticuerpos (o inmunoglobulinas, designadas Ig), para uso terapéutico, los ensayos de citotoxicidad aparecen entre la larga lista de los ensayos de control calidad requerida por la reglamentación antes de la introducción en el mercado de estas moléculas.

25 Según los textos reglamentarios, estos ensayos deben reflejar lo máximo posible la actividad biológica del medicamento en su utilización clínica, basándose en sus mecanismos de acción conocidos o supuestos. Ahora bien, los modos de acción de los anticuerpos son variados:

30 * mecanismos que dependen de la región Fab del anticuerpo: acción directa de los anticuerpos por su actividad de enlace al antígeno. Estos mecanismos son específicos de cada anticuerpo y pueden corresponder a i) la neutralización de un antígeno, ii) la neutralización de un antígeno membranario por antagonismo o iii) la acción sobre un antígeno membranario. En estos dos últimos casos, la acción agonista o antagonista sobre un antígeno membranario puede llevar a una inhibición del crecimiento de la población celular diana y/o a la inducción de su muerte por apoptosis y/o necrosis.

35 * mecanismos efectores mediados por la región Fc: mecanismos comunes a todos los anticuerpos, su intensidad depende de la clase y de la sub-clase de los anticuerpos, así como de su estructura fisicoquímica (secuencia en aminoácidos, estructura y composición de las cadenas glicosiladas, etc.). Estas funciones efectoras medidas por la región Fc dependerán de la interacción de dicha región Fc con dos grandes tipos de receptores específicos del sistema inmunitario: i) el sistema del complemento mediante la interacción entre la región Fc y el primer componente C1 de la cascada proteolítica del complemento; ii) los receptores a las regiones Fc de los anticuerpos para Ig (anotados FcR).

40 En numerosos casos, en particular cuando el anticuerpo se dirige contra una molécula membranaria, el mecanismo buscado para observar el efecto terapéutico es de tipo lítico (por ejemplo, en el caso de una utilización en onco-hematología). La lisis puede obtenerse, por ejemplo, por inducción de la apoptosis/necrosis o por la inhibición de la proliferación celular mediante unos fenómenos de agonismo/antagonismo, por activación del sistema del complemento o por reclutamiento de células citotóxicas que expresan en superficie uno de los FcR (tales como células asesinas naturales [Natural Killer cell o NK], macrófagos, linfocitos, citotóxicos, células polinucleares, etc.). En tales casos, los textos reglamentarios imponen la implantación de un ensayo de "potencia" que mide la lisis celular de una manera biológicamente pertinente y coherente con el modo de acción considerado *in vivo*.

45 Un primer objetivo de la invención es por lo tanto proponer un método de medición directa de la muerte de células (citotoxicidad) por medición de la cantidad liberada en el medio de una enzima introducida artificialmente en dichas células.

Estado de la técnica

5 Los ensayos de citotoxicidad, o citólisis, se utilizan muy ampliamente en investigación biológica, clínica y farmacéutica, para medir la muerte celular inducida por cualquier sustancia biológicamente activa, mediante cualquier mecanismo biológicamente relevante, a fin de cribar un banco de moléculas candidatas, identificar un mecanismo de acción o caracterizar la actividad biológica de un producto farmacéutico por ejemplo (ensayo de "potencia").

10 Un ensayo de citotoxicidad realizado en el ámbito de una medición de "potencia" consiste en medir la muerte de células de interés (generalmente denominadas células diana) en condiciones experimentales coherentes con el mecanismo biológico considerado. En el ámbito de los anticuerpos terapéuticos, se pueden explorar mediante este ensayo tres mecanismos de acción principales: 1) una inducción de apoptosis por agonismo o antagonismo de una molécula membranaaria por el anticuerpo; 2) una activación del sistema del complemento (CDC por "Complement-Dependent Cytotoxicity") por el anticuerpo absorbido a la célula diana; 3) un mecanismo de lisis, por ADCC (por "Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity") o por fagocitosis, mediada por unos factores celulares reclutados a través de la interacción entre los FcR que expresan en su superficie y la región Fc de los anticuerpos absorbidos a las células diana. Para realizar cada uno de estos ensayos, unas células diana se incuban con el anticuerpo considerado en presencia, respectivamente, 1) del medio de cultivo solo, 2) del medio de cultivo que contiene una fuente de complemento o 3) del medio de cultivo que contiene unas células efectoras apropiadas.

Existen en la actualidad varios métodos de medición directa de la muerte celular, es decir cuyos datos medidos resultan directa y efectivamente de la muerte de las células diana:

25 a) método de liberación de un isótopo radioactivo (^{51}Cr , ^{111}In , ^3H). Este método consiste en incubar, previamente a la experiencia de citólisis en sí, las células diana en una solución de cromato de sodio, que penetra en las células para fijarse a las proteínas intracelulares. Cuando las células mueren, su contenido intracelular se libera en el sobrenadante. Una medición de la radioactividad del sobrenadante permite por lo tanto una medición directa de la cantidad de células diana muertas, incluso si otros tipos de células (por ejemplo unas células citotóxicas efectoras) se han mezclado con las células diana durante el ensayo, ya que sólo las células diana se han radiomarcado. El ruido de fondo del método (es decir la intensidad de la señal en ausencia de muerte celular) es mínimo debido a una liberación espontánea de ^{51}Cr muy baja sobre el tiempo medio que dura un ensayo de citotoxicidad (de 3 a 4 horas como mínimo). Además, debido a su naturaleza radioactiva, la señal generada es muy intensa, lo que conduce a una relación señal/ruido elevada (del orden de 5 a 12). El método es por lo tanto muy sensible. Desarrollado al final de los años 1960, este método es todavía, en la actualidad, el método de referencia, debido a su especificidad frente a la muerte de las células diana y a sus rendimientos elevados, especialmente en términos de sensibilidad. Presenta además buenas capacidades de análisis de alto rendimiento debido a la estabilidad de la señal durante largos periodos de tiempo (desde varias horas hasta varios días). Por el contrario, presenta el inconveniente de necesitar un tiempo incompresible de marcado con ^{51}Cr (incubación y lavados) de aproximadamente una a dos horas según los protocolos, alargando de manera significativa la duración del experimento. Además, el marcado añade variabilidad al ensayo, relacionado con la cantidad y la calidad de los reactivos añadidos, en los diferentes tiempos de incubación y etapas experimentales. Finalmente, las obligaciones reglamentarias relacionadas con la utilización de la radioactividad son cada vez más engorrosas y costosas, en términos de autorización administrativa, de gestión de los recursos, de eliminación de los desechos, de legislación laboral, de seguimiento médico o de exposición de los manipuladores. Por otro lado, se han descrito varias variantes de este método, utilizando otros radio-isótopos, por ejemplo basadas sobre la utilización de tritio (^3H) o de indio (^{111}In) pero que implican las mismas obligaciones de radioprotección y, por lo tanto, sometidas a las mismas limitaciones.

50 b) método con calceína-acetoximetilo (calceína-AM). Este compuesto es permeable a las bicapas lipídicas (por lo tanto, a las membranas de las células eucariotas) gracias a su radical acetoximetilo y penetrará por lo tanto en las células. Una vez en el interior, el radical acetoximetilo se escinde por unas enzimas (esterasas) intracelulares, restaurando entonces las propiedades de fluorescencia de la calceína. La calceína liberada en el sobrenadante sirve para medir la cantidad de células lisadas. Este método presenta interesantes capacidades de análisis de alto rendimiento, evitando las problemáticas de radioactividad. Por otro lado, la liberación espontánea de calceína es muy elevada (aproximadamente un 40% de la liberación máxima) lo que refleja una fuerte permeabilidad de la membrana plasmática a la calceína, lo que conduce a un ruido de fondo elevado del método. Al ser débil la señal fluorescente emitida por la calceína, la relación señal/ruido es poco favorable, en los alrededores de 2,5. Este método presenta por lo tanto una sensibilidad y unos rendimientos poco elevados y comprende una etapa de marcado de las células diana con la calceína-AM que aumenta la duración experimental global del ensayo de una a dos horas y amplifica todavía más su variabilidad.

65 c) método basado sobre la utilización de lantánidos, tales como el europio (Eu^{3+}) o el terbio (Tb^{3+}), complejados con un quelato o amplificador de fluorescencia tales como el dietilentriaminopentaacetato (DTPA), o el ácido 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxílico (TDA), similares en su principio a los métodos del ^{51}Cr y de la calceína-AM. Por ejemplo, en la tecnología DELFIA (comercializada por Perkin Elmer, Boston, MA), se cargan unas células diana con un ligando amplificador de fluorescencia, BATDA (bis [acetoximetil]2,2':6',2"-terpiridin-6,6"-dicarboxilato) que penetra

- a través de las membranas plasmáticas. En la célula, los enlaces ésteres se hidrolizan por unas esterasas para formar un ligando hidrófilo, el TDA, en teoría poco permeable a la membrana (después de la adición de probenecid, un inhibidor de MDR, "Multi Drug Resistance" transportador) y liberado en el medio extracelular durante la citólisis. Después de la extracción del sobrenadante, se añade una solución de europio (Eu) a fin de que éste se compleje con el TDA libre para formar un quelato fluorescente (EuTDA). La medición de esta señal, de tipo TRF ("Time-Resolved Fluorescence") es indicadora de la cantidad de células lisadas. En otro caso, las células diana se marcan con europio y su liberación en el sobrenadante se mide por la adición del quelato DTPA. Estos métodos son no radioactivos y presentan una capacidad de análisis de alto rendimiento. Sin embargo, la liberación espontánea de TDA o de europio libres es bastante elevada y variable según el tipo celular: la liberación máxima para el Eu^{3+} es el doble de aquella con ^{51}Cr . En algunos casos (figura 1), la intensidad de la liberación espontánea es casi igual a la de la señal específica y presenta una variabilidad en la intensidad de señal relacionada con el tipo celular considerado o con el estado fisiológico de la célula (que condiciona por ejemplo la naturaleza y la actividad de sus esterasas). Este método necesita también un tiempo experimental de marcado de las células diana con europio o BATDA, así como un tiempo de incubación de los sobrenadantes con el segundo componente (respectivamente TDPA o Eu^{3+}) aumentando la duración experimental global del ensayo y su variabilidad por adición de etapas suplementarias. El conjunto de estas limitaciones genera una variabilidad del ensayo de Eu^{3+} bastante elevada, así como una imposibilidad de usarla con un cierto número de tipos celulares, que hacen su utilización y su validación difícil en un contexto industrial.
- d) métodos que utilizan la técnica de la citometría de flujo (y a su derivado del tratamiento de imágenes por citometría de flujo) para medir la frecuencia de células vivas y/o muertas durante el ensayo. Estos métodos tienen en común utilizar una combinación de uno o varios marcadores fluorescentes para distinguir las poblaciones de células diana y efectoras. Alternativamente, algunos autores han utilizado un marcado definitivo de las células diana transformándolas genéticamente para expresar establemente una proteína fluorescente. Este marcado de las poblaciones diana está acoplado a una detección de la viabilidad de las células por el uso de marcadores apropiados (generalmente unos agentes intercalantes del ADN impermeables a las membranas de las células vivas pero que penetran en las células apoptóticas o muertas). La combinación de estos marcadores permite determinar una frecuencia y/o un número de células muertas o vivas dentro de una población dada (generalmente las células diana). Estos métodos, aunque específicos del mecanismo de muerte celular, no permiten un análisis de alto rendimiento debido a restricciones técnicas relacionadas con la citometría de flujo. Por ejemplo, algunas sondas pueden inducir a unos marcados cruzados durante la reacción (por intercambio entre los diferentes tipos celulares de sondas unidas por unos enlaces no covalentes). En función de los métodos y de los equipos, el tiempo de adquisición de una muestra de citometría puede alcanzar de varios segundos hasta unas decenas de segundos. La adquisición no simultánea de las muestras que resulta tiene como consecuencia que puede pasar varias decenas de minutos entre la primera y la última muestra de una serie, tiempo durante el cual las condiciones fisiológicas de las células pueden evolucionar. Estos diferentes elementos tienen unas consecuencias importantes sobre la variabilidad de los ensayos y, para alcanzar con estos métodos unos rendimientos compatibles con los estándares de la industria farmacéutica, el análisis puede superar sólo algunas muestras (en la práctica no más de tres) ensayadas simultáneamente, lo que corresponde a un bajo rendimiento.
- e) método basado en un recuento bajo microscopio por un operario o por un sistema automatizado. La distinción entre células muertas y vivas y su recuento se realiza gracias al uso de un colorante vital, por ejemplo el azul de tripano o la eosina. Sin embargo, estos métodos microscópicos no permiten discriminar entre varios tipos celulares distintos que se habían mezclado para las necesidades del ensayo (en el caso de una medición de ADCC por ejemplo), salvo que se utilicen métodos de microscopía de fluorescencia. Se vuelve entonces a unos métodos similares de los descritos para la citometría de flujo pero que utilizan unos métodos de recuento laborioso y cuyos inconvenientes ya citados se amplifican todavía más. Estos métodos, lentos, poco reproducibles y nada adecuados para un análisis de alto rendimiento, no se emplean en la práctica en el ámbito de ensayo de "potencia".
- f) variación de impedancia: un cierto número de métodos electrónicos existen para medir el desenganche de las células adherentes a un soporte (pudiendo deberse este fenómeno a la muerte de las células, de manera no exhaustiva). Estos métodos se basan generalmente en la medición de una variación de impedancia inducida por la cantidad y/o el estado fisiológico de las células presentes en un soporte adecuado. Sin embargo, tales métodos no son adecuados cuando se mezclan varios tipos celulares diferentes y cuando se debe medir la muerte de un solo tipo (caso de los ensayos de ADCC, por ejemplo). Además, estos métodos necesitan la utilización de células diana adherentes, un equipo costoso, frecuentemente asociado a un dispositivo experimental complejo. Y, sobre todo, la medición del desprendimiento celular no corresponde a los mecanismos de citólisis; puede, como mucho, correlacionarse con ella. Así, su utilización en un ámbito industrial es por lo tanto difícil.
- g) métodos basados en la detección de componentes expresados naturalmente en el citoplasma de las células eucariotas. Tales moléculas deben estar libres en el citoplasma (es decir, no incluidas en unas vesículas ni unidas a unos orgánulos) para poder liberarse en el sobrenadante en caso de lisis de la célula, pero no deben secretarse en el medio extracelular cuando las células están en su estado fisiológico. Su presencia en el sobrenadante debe ser fácilmente medible mediante métodos habituales y deben expresarse energicamente (es decir, un gran número de moléculas por célula) y esto mediante la mayor cantidad posible de tipos celulares diferentes (moléculas ubicuas). Existe un gran número de soluciones descritas o de kits disponibles en el comercio que reivindican una medición de

la citotoxicidad por tales métodos. Las tecnologías de revelación se apoyan en general en la adición al sobrenadante de uno o varios tampones, sustratos, enzimas y/o reactivos que permiten realizar la evaluación generando una molécula final medible por bioluminiscencia, quimioluminiscencia, colorimetría o fluorescencia. Cabe señalar que, en la mayoría de los casos, estos ensayos pueden utilizarse también "al revés" para determinar la viabilidad global de la población celular. Estos métodos presentan la ventaja de no necesitar un marcador específico de las células diana (lo que reduce el riesgo de variabilidad y también el tiempo de manipulación) y permiten, debido a su naturaleza, unos análisis de alto rendimiento. Sin embargo, el inconveniente principal e inaceptable de todos estos ensayos basados en la liberación de una molécula ubicua para medir la lisis celular, es que no son más pertinentes una vez que se mezclan varios tipos celulares para la realización del ensayo. En efecto, es entonces posible discriminar cuál de los tipos celulares participó, y en qué proporción, en la liberación de la molécula. Este es, por ejemplo, el caso de los ensayos de ADCC en los cuales se deben mezclar unas células diana y unas células efectoras para observar el efecto citotóxico. Las células efectoras muertas durante el ensayo, en relación con su porcentaje de mortalidad habitual o por unos mecanismos relacionados con el ensayo en sí (tales como el agotamiento o la lisis redirigida por ejemplo), participarán, ellas también en la señal. En este sentido, no se trata, por lo tanto, de métodos específicos de la lisis de las células diana. Además, algunas moléculas a medir no son suficientemente estables durante el tiempo del ensayo (por ejemplo el ATP tiene una vida media muy corta en el medio extracelular), otros presentan un ruido de fondo elevado y/o una intensidad de la señal débil que conduce a una falta de sensibilidad del método.

A la vista de estos elementos, otro objetivo de la invención es por lo tanto proponer un método de citotoxicidad no radioactiva, a fin de librarse de las numerosas restricciones reglamentarias y de salud. NOUYE SATOSHI *ET AL*: "Unconventional sécrétion of the mutated 19kDa protein of Oplophorus luciferase (nanoKAZ) in mammalian cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 450, nº 4, 11 de julio de 2014 (2014-07-11), páginas 1313-1319, divulga la enzima Nanokaz, que es una luciferasa del organismo Oplophorus; pero este no se ha utilizado en el contexto de un ensayo citotóxico.

J. M. Coppola *ET AL*: "Noninvasive Imaging of Apoptosis and Its Application in Cancer Therapeutics", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, nº 8, 27 de marzo de 2008 (2008-03-27), páginas 2492-2501, divulga la utilización de un procedimiento tal como se menciona en el punto 3.1 (con la diferencia de que un péptido con actividad de luciferasa ANLuc-DEVD-BCLuc se utiliza en lugar de una luciferasa integral) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), medir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o medir la apoptosis.

Otro objetivo de la invención es proponer un método de citotoxicidad que no necesita un marcado extemporáneo de la célula diana (a fin de no implicar una pérdida de tiempo experimental y un aumento de la variabilidad global del ensayo por adición de varias etapas variables), conservando al mismo tiempo una medición directa y específica de la lisis de dicha célula.

Para paliar los inconvenientes antes citados y evitar la necesidad de un marcado extemporáneo de la célula diana, conservando al mismo tiempo una medición directa y específica de la lisis de dicha célula Schäfer *et al.* han descrito en 1997 (Journal of Immunological Methods, 204 p 89-98, 1997) un método de transformación genética para obtener unas líneas de células diana que expresan establemente una enzima exógena intra-citoplásmica. En este método, la muerte de dichas células tenía que, en teoría, permitir la liberación de esta enzima en el medio extracelular, midiéndose entonces la cantidad de enzima por un método apropiado. Estos autores han realizado en primer lugar la transformación de una línea diana por el gen de F-Luc (Firely Luciferase, luciferasa de luciérnaga) bajo el control del promotor de la beta-actina. Sin embargo, la duración de vida útil de la F-Luc en el medio extracelular es muy corta (vida media de 30 minutos) e incompatible con un ensayo de ADCC o de CDC cuyo mecanismo de acción necesita de 2 a 4 horas para alcanzar el máximo de células lisadas. Después, han evaluado la transformación de las células diana por la beta-galactosidasa y se han comparado estos rendimientos con los del método con marcado por el cromó radioactivo tradicional. A pesar de que la beta-galactosidasa se revela más estable que la F-Luc, y de que la relación señal/ruido sea mejor con la beta-galactosidasa que con el método con cromó radioactivo, el método con la beta-galactosidasa subestima aproximadamente del 30 al 40% la cantidad de células muertas, probablemente por causa de una liberación incompleta de esta enzima durante la muerte de las células. Por lo tanto no es aplicable para medir eficazmente la muerte de células diana en un ensayo no radioactivo de caracterización de anticuerpos terapéuticos que tienen como objetivo satisfacer las exigencias reglamentarias, por ejemplo en el ámbito de la caracterización de las actividades ADCC y CDC.

Más recientemente, otros autores han descrito la utilización de células diana que expresan constitutivamente la F-Luc en un ensayo de ADCC, basado en un principio diferente (Alpert *et al.*, J. Virol. 86:12039, 2012; Fu *et al.*, PLoS ONE 5:e11867, 2010): la cuantificación de la señal luminiscente que sirve para evaluar la cantidad de células vivas. Por lo tanto, no se trata de un método de medición directa de la muerte de las células diana, que está además sujeto a algunas limitaciones. Así, siendo la vida media de la F-Luc corta, siendo el ensayo relativamente largo (8 horas), la actividad F-Luc es sensible a variaciones tales como una eventual perturbación del estado fisiológico de las células durante el ensayo (disminución de la síntesis, aumento del catabolismo), sin que esta variación esté directamente relacionada con una modificación de la mortalidad celular y generando de hecho un primer nivel de variabilidad del método. Asimismo, realizándose la medición de manera homogénea sobre la suspensión celular lisada después del ensayo, es muy probable que la F-Luc producida durante el ensayo (o al menos durante las últimas horas, dada su

corta vida media) y liberada por las células muertas en el sobrenadante, generará un segundo nivel de variabilidad añadiendo su señal al de la F-Luc puramente intracelular. Por otro lado, se ha relevado por los autores la presencia de una actividad F-Luc residual en el sobrenadante. Finalmente, este método necesita tiempos experimentales muy largos (al menos 8 horas) para que la pérdida de señal sea suficientemente significativa. Este método no es aplicable, por lo tanto, a la caracterización funcional de anticuerpos terapéuticos en el ámbito de ensayos de "potencia" conformes a las exigencias reglamentarias.

Otro objetivo de la invención es por lo tanto paliar los inconvenientes antes citados y proponer un método que incluya una etapa de transformación genética para obtener unas líneas de células diana que expresan, de manera estable durante toda la duración del ensayo, una enzima exógena intra-citoplásmica, permitiendo la muerte de dichas células la liberación (casi total) de esta enzima en el medio extracelular.

Otro objetivo de la invención es proponer un método de medición directa, sensible y específica de la muerte de las células diana (y no una medición de la desaparición de las células vivas), que sea aplicable, en particular, a la caracterización funcional de anticuerpos terapéuticos en el ámbito de ensayos de "potencia".

Estos objetivos, así como otros, se alcanzan mediante el procedimiento, según la presente invención, no radioactivo de determinación (control y cuantificación) *in vitro* directa de la acción citolítica de un agente activo frente a células diana y/o de un medio que rodea unas células diana, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

i) transformación genética de células diana para expresar una enzima exógena a dichas células diana,

ii) exposición de dichas células diana genéticamente transformadas con el agente activo y/o con dicho medio del entorno a ensayar, que puede conducir a la lisis de al menos una parte de las células diana liberando dicha enzima exógena en el medio extracelular,

iii) medir la actividad de la enzima exógena liberada durante la lisis de dichas células diana

caracterizado por que dicha enzima exógena es una enzima de masa molar inferior o igual a 45 kDa, y cuya actividad es detectable por luminiscencia o fluorescencia, tal como se describe en las reivindicaciones.

Así, la liberación de esta enzima exógena, especialmente debido a su tamaño reducido, es representativa de la lisis de las células diana y da unos resultados, en términos de ruido de fondo, de lisis máxima, de lisis específica y de rendimientos globales, similares o superiores al método de referencia de ⁵¹Cr, como se demostrará más adelante en los ejemplos.

Ventajosamente, la masa molar de la enzima exógena es inferior o igual a 30 kDa, preferentemente inferior o igual a 25 kDa, más preferiblemente inferior o igual a 20 kDa.

De manera ventajosa, dicha enzima exógena presenta una actividad enzimática estable en el medio extracelular de las etapas ii) y iii) de dicho procedimiento durante al menos 3 horas, preferentemente durante al menos 24 horas y más preferentemente durante al menos 48 horas, a temperaturas comprendidas entre 34°C y 40°C.

Dicha enzima exógena es una luciferasa.

Además, dicha enzima exógena posee una secuencia peptídica que puede presentar al menos un 60% de homología, preferentemente al menos un 80% de homología con la secuencia peptídica salvaje de la sub-unidad 19 kDa de la luciferasa producida por la gamba *Oplophorus gracilirostris*.

De manera preferida, dicha enzima exógena está bajo una forma con actividad y estabilidad optimizadas, comercializada por la compañía Promega bajo el nombre de NanoLuc[®], denominada en el conjunto del texto nanoluciferasa.

Tal enzima es en particular estable en el medio extracelular sobre periodos de tiempo compatibles con los tipos de ensayos considerados, es decir al menos 24 horas.

La cantidad de enzima exógena liberada se mide por escisión de un sustrato específico de dicha enzima, siendo el sustrato preferentemente de la familia de la coelenterazina, más particularmente de la familia de la furimazina y de sus derivados.

El medio a ensayar que rodea las células diana puede comprender un agente biológico y/o un agente químico y/o un agente físico potencialmente activo(s) frente a dichas células diana.

El procedimiento comprende por lo tanto como primera etapa i) la transformación genética de una línea pertinente de células diana para que exprese establemente dicha enzima exógena, secretada en el citoplasma en condiciones fisiológicas.

Según un primer modo de realización de la invención, el agente biológico es un anticuerpo, preferentemente seleccionado entre los anticuerpos monoclonales, en particular con objetivo terapéutico.

5 En el caso de los anticuerpos o moléculas emparentadas, la elección de la célula diana soporte se realiza en función de la diana del anticuerpo a ensayar. En cada nuevo modelo experimental (para una diana antigénica dada), se desarrolla una nueva célula diana, salvo si una misma diana expresa natural o artificialmente varios antígenos pertinentes.

10 Son posibles varias opciones para la elección de estas células diana.

La primera opción es seleccionar, entre las líneas celulares disponibles de los diferentes bancos de depósito de material biológico, una línea pertinente para el modelo a desarrollar. Algunas de estas líneas se darán a título de ejemplo en el párrafo siguiente, limitadas a algunas dianas antigénicas para las cuales existen actualmente anticuerpos comercializados. Se entiende, por supuesto, que son posibles otras líneas para las moléculas antigénicas citadas, pero también para otras dianas antigénicas no citadas pero para las cuales se desarrollarán anticuerpos o están en curso de desarrollo.

En el caso de los anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por los linfocitos B normales o patológicos, tales como CD19, CD20 o IL-6R (CD126), todas las líneas de tipo linfocitos o linfomas B son unas candidatas posibles, por ejemplo las líneas WIL2, WIL2-S, Daudi, Raji, Ramos, JY, MC116, GA-10, DOHH, ARH-77, SU-DHL, Z138 o sus derivados. En el caso de anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por los linfocitos T normales o patológicos, tales como CD3, CD25 o LPAM ("Lymphocyte Peyer Patch Adhesion Molecule" o integrina alfa[4]beta[7]), todas las líneas de tipo linfocitos o linfocitos T son unas potenciales candidatas, como por ejemplo las líneas Jurkat, DERL, HD-MAR-2, HH, SR-786, SUP-T1, Loucy, CCRF-CEM, HUT-78 o sus derivados. Los anticuerpos pueden también ser unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células de origen linfoide normales o patológicas, tales como CTLA-4 (CD152), PD-1 (CD279) o CD30 humanas; en este caso, todas las líneas de linfocitos B y T serían unas candidatas potenciales, por lo tanto, por ejemplo, todas las líneas B y T ya citadas anteriormente. Los anticuerpos pueden también ser unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células de origen linfoide y mieloide normales o patológicas, tales como CD52, VLA4 (CD49d) o LFA-1 (CD11a) humanas; en este caso, toda la línea celular de linaje linfoide o mieloide sería apropiada, es decir, además de las líneas de linfocitos B y T ya citadas anteriormente, unas líneas mieloides tales como THP-1, HL-60 o U-937 o sus derivados, por ejemplo. Los anticuerpos pueden también ser unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células carcinoides, tales como anti-EGFR (por "Epidermal Growth Factor Receptor", también denominado HER1 o ErbB1), EGFR2 (o HER2, o ErbB2), EGFR-3 (o HER3, o ErbB3) o EpCAM (CD326): cualquier línea procedente de tumores carcinoides es entonces una candidata potencial, por ejemplo, HCC1954, SKBR3, SKOV3, Caco-2, HeLa, MCF-7, PC-3 o sus derivados. El anticuerpo puede también ser un anticuerpo dirigido contra la molécula TNF-alfa: las líneas de linfocitos T o de tipo mieloide tales como se han descrito anteriormente son entonces unas candidatas potenciales. El anticuerpo puede también ser un anticuerpo dirigido contra la molécula VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor") o su receptor VEGFR: unas líneas descritas para expresar estas moléculas serían apropiadas, por ejemplo las líneas A375, M21, Hoc-7, Panc-3, D283Med, DAOY, D341Med o sus derivados.

La otra opción posible para la construcción de líneas de células diana pertinentes es disponer de una misma línea de células que expresan la enzima exógena seleccionada, en la que una o varias dianas antigénicas de interés llegarían a integrarse, en un segundo paso, por las técnicas clásicas de transformación genética. En este caso, cualquier línea celular puede convenir mientras que tenga un potencial diferente de cero de transformación genética. Preferentemente, la línea seleccionada no expresará ningún potencial antígeno diana humano que podría llegar a perturbar la expresión de las moléculas introducidas por ingeniería genética, y por lo tanto aumentar la variabilidad de expresión de las moléculas, y por lo tanto aumentar la variabilidad general del ensayo. Por ejemplo, estas células pueden ser de origen no humano, tales como las células CHO, Sp2/0, NS0, NIH3T3 o sus derivados, o de origen humano embrionario tales como las células HEK293, IMR-90, NTera2 o sus derivados.

Según un segundo modo de realización de la invención, el agente químico y/o físico se selecciona entre los agentes de quimioterapia o las moléculas anti-cancerosas, preferentemente unas moléculas citotóxicas o unas moléculas de la familia de los inhibidores de las proteínas quinasas.

De manera ventajosa, el procedimiento consistió en hacer expresar la nanoluciferasa a las células diana.

Esta nanoluciferasa es una proteína derivada de la sub-unidad de 19 kDa de una luciferasa extraída de la gamba de aguas profundas *Oplophorus gracilirostris*, siendo la segunda sub-unidad una proteína de 35 kDa (proteínas descritas en el artículo de S. Inouye *et al.*, Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase, en FEBS Letters, 481 (2000) 19-25). Esta nanoluciferasa se ha optimizado y comercializado por la compañía Promega bajo el nombre de Nanoluc[®] (y se describe en M. Hall *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate in ACS

5 Chemical Biology 2012, 7, 1848-1857), con el objetivo de mejorar los sistemas de genes informadores para unos sistemas i), de estudio de la interacción proteína-proteína o proteína-ligando; ii) de estudio de estabilidad proteica; iii) de biosensores donantes de energía hacia una tercera molécula aceptora (BRET); iv) de procesamiento de imágenes *in vivo*; v) de estudios de la carga y de la replicación virales; y vi) de ensayos informadores para la
 10 señalización celular (estudios de expresión de genes o de seguimiento del metabolismo intracelular de las proteínas). En la actualidad, se han descrito especialmente: la utilización intracelular como gen informador (vías de señalización, unión a un receptor, por ejemplo), el procesamiento de imágenes sobre células/animales vivos (marcado de células para seguir su camino biológico) o el marcado de bacterias o de virus para el seguimiento de infecciones; el acoplamiento de la nanoluciferasa a una proteína de interés para medir su internalización o su
 15 secreción (Norisada *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 449:483, 2014). Estos sistemas tienen en común el acoplamiento de la secuencia codificante de la nanoluciferasa a la de otra proteína de interés y/o a la secuencia de un promotor genético activado específicamente por la vía de señalización estudiada y/o restringirse a una detección intracelular de la molécula.

20 Por el contrario, el enfoque de los inventores consistió en proponer un procedimiento en el que las células diana se transforman genéticamente a fin de expresar transitoria o constitutivamente dicha enzima exógena (por ejemplo, la nanoluciferasa) en una forma citoplásmica y no secretada, más particularmente en hacer expresar dicha enzima sola y en forma libre en el citoplasma de las células diana y en medir única y específicamente la cantidad de moléculas liberadas en el medio extracelular tras la lisis de las células por unos mecanismos tales como ADCC, CDC, apoptosis o lisis por un detergente.

25 Para este fin, la etapa de transformación genética de las células diana comprende ventajosamente la introducción en dichas células de un vector de expresión que lleva la secuencia codificante de la enzima exógena y un promotor de tipo constitutivo que permite su transcripción en una célula, tal como una célula eucariota.

Preferentemente, el vector puede ser un vector viral, o un vector plasmídico, preferentemente un vector plasmídico.

30 Ventajosamente, el vector de expresión de la enzima exógena comprende un gen de resistencia a los antibióticos. Este gen de resistencia a los antibióticos permite una selección de las células diana eucariotas que han integrado el vector (células denominadas "transformadas"). El antibiótico de selección es capaz, especialmente, de eliminar las células eucariotas que no llevan el gen de resistencia. Este gen de resistencia a los antibióticos puede ser, en particular, un gen de resistencia a la genecitina (G418), la puomicina, la blasticidina, la higromicina B, el ácido micofenólico o la zeocina, preferentemente un gen de resistencia a la puomicina.

35 De manera preferida, la introducción de dicho vector de expresión en dichas células se realiza por infección por unas partículas virales que llevan el gen de la enzima exógena, cuando el vector de expresión es un vector viral o por unos métodos químicos o físicos cuando el vector de expresión es un vector plasmídico. Cuando el vector es un vector plasmídico, la introducción en las células diana se realiza ventajosamente por electroporación.

40 Estos diferentes elementos constitutivos se ensamblan según los métodos clásicos de clonación por biología molecular: utilización de enzimas de restricción acopladas o no a reacciones de polimerización en cadena (PCR) a fin de aislar las secuencias de ADN de interés y re-ligadura de los diferentes constituyentes gracias a unas enzimas de reparación o de síntesis del ADN (ligasas o ADN polimerasas, por ejemplo). Se dispone entonces de un sistema que permite la transformación genética de una célula diana para que exprese la enzima exógena (por ejemplo, la nanoluciferasa) en su compartimiento citoplásmico. Un ejemplo de sistema de transformación celular basado en la trasposasa piggyBac se da en la figura 5.

45 Aunque no sea indispensable para la realización de la presente invención, se recomienda proceder después a una etapa de clonación de estas mezclas celulares. Esto permite obtener una línea de células diana que expresan la nanoluciferasa y procedente de una sola célula (o clon), lo que favorecerá la homogeneidad y la reproducibilidad de los resultados del ensayo de citotoxicidad.

50 El procedimiento según la invención encuentra una utilización interesante para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), medir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o medir la apoptosis.

La presente invención se refiere también a un kit para la realización del procedimiento descrito anteriormente, o su utilización, que comprende:

- 60 - una línea de células diana que expresa la enzima exógena,
- unas células efectoras citotóxicas para la realización de un ensayo de ADCC y/o una fuente de complemento para la realización de un ensayo de CDC,
- 65 - un sustrato que activa dicha enzima exógena para producir una emisión de luz y las eventuales soluciones tampones asociadas,

- un prospecto explicativo.

5 La presente invención se describirá ahora más en detalle con la ayuda de los ejemplos no limitativos siguientes, mencionados a título ilustrativo, en referencia a las figuras en las que:

La figura 1 muestra unos resultados obtenidos con el método de la técnica anterior calceína-AM (DELFIAM) (ejemplo comparativo A);

10 La figura 2 muestra la comparación entre el método con ⁵¹Cr y un método TR-FRET que utiliza dos anticuerpos, donante y aceptor (ejemplo comparativo B);

15 La figura 3 muestra los resultados preliminares de un método TR-FRET que utiliza un anticuerpo donante y GFP (ejemplo comparativo C);

La figura 4 muestra la linealidad de la señal luminiscente generada por la nanoluciferasa así como la linealidad de la relación entre el número de células en los pocillos después de la lisis con Tritón X-100 y la intensidad de la señal;

20 La figura 5 muestra el mapa de los plásmidos utilizados para transformar las células diana;

La figura 6 ilustra la intensidad de la señal luminiscente obtenida en función del factor de dilución aplicado al sustrato de la nanoluciferasa;

25 La figura 7 presenta la correlación entre el porcentaje de mortalidad medido por citometría de flujo y el porcentaje de lisis específica obtenida por el método de la nanoluciferasa;

La figura 8 describe la influencia del tiempo de reacción sobre la medición de la lisis específica de las células diana en un ensayo de ADCC que utiliza el método;

30 La figura 9 muestra la comparación directa de los métodos nanoluciferasa ("lumi.") y cromo-51 ("51Cr") sobre el modelo Raji en un ensayo de ADCC (N=3 experimentos, realizados por 2 operarios diferentes: 2 experimentos por el operario nº 1 y 1 experimento por el operario nº 2);

35 La figura 10 muestra la dispersión de los datos de Emax y de Emin de los experimentos de ADCC descritos en la figura 9;

La figura 11 muestra la dispersión de los datos de EC50 de los tres experimentos de ADCC descritos en la figura 9;

40 La figura 12 muestra los resultados del cálculo de "potencia" para los 3 experimentos de ADCC descritos en la figura 9;

La figura 13 muestra la comparación directa de los métodos nanoluciferasa ("lumi.") y cromo-51 ("51Cr") sobre el modelo Raji en un ensayo de CDC (N=3 experimentos, realizados por 2 operarios diferentes: 2 experimentos por el operario nº 1 y 1 experimento por el operario nº 2);

45 La figura 14 muestra la dispersión de los datos de Emax y de Emin de los experimentos de CDC descritos en la figura 13;

La figura 15 muestra la dispersión de los datos de EC50 de los tres experimentos de CDC descritos en la figura 13;

50 La figura 16 muestra los resultados del cálculo de "potencia" para los 3 experimentos de CDC descritos en la figura 13;

55 La figura 17 muestra la comparación directa de los métodos nanoluciferasa ("lumi.") y cromo-51 ("51Cr") sobre el modelo SKOV3 en un ensayo de ADCC (N=3 experimentos, realizados por 2 operarios diferentes: 2 experimentos por el operario nº 1 y 1 experimento por el operario nº 2);

60 La figura 18 muestra la dispersión de los datos de Emax y de Emin de los experimentos de ADCC descritos en la figura 17;

La figura 19 muestra la dispersión de los datos de EC50 de los tres experimentos de ADCC descritos en la figura 17;

65 La figura 20 muestra los resultados del cálculo de "potencia" para los tres experimentos de ADCC descritos en la figura 17;

La figura 21 muestra la comparación directa de los métodos nanoluciferasa y cromó-51 sobre el modelo CHO-TNF-alfa en un ensayo de CDC;

5 La figura 22 muestra la dispersión de los datos de Emax y de Emin de los experimentos de CDC descritos en la figura 21;

La figura 23 muestra la dispersión de los datos de EC50 de los tres experimentos de CDC descritos en la figura 21;

10 La figura 24 muestra los resultados del cálculo de "potencia" para los 3 experimentos de CDC descritos en la figura 21;

La figura 25 muestra los resultados del cálculo de "potencia" para 3 experimentos de ADCC realizados en el modelo CHO-TNF-alfa;

15 La figura 26 resume los experimentos de evaluación de la influencia de las interacciones celulares sobre la medición de la lisis específica de las células diana en un ensayo de ADCC o de CDC que utiliza el método nanoluciferasa;

20 La figura 27 ilustra la capacidad del método de liberación de la nanoluciferasa para medir la muerte de las células diana inducidas por un tratamiento pro-apoptótico de tipo físico;

La figura 28 ilustra la capacidad del método de liberación de la nanoluciferasa para medir la muerte de las células diana inducidas por un tratamiento pro-apoptótico de tipo químico.

25 Ejemplos

En el procedimiento según la presente invención descrito a continuación, las células diana se han permeabilizado en una serie de descargas eléctricas (electroporación) en presencia de los dos plásmidos de interés presentados en la figura 5, llevando uno el transgén de la nanoluciferasa y el otro el de la enzima que permite su integración en el genoma, la transposasa PiggyBac.

30 Leyenda de la figura 5:

- AmpR: gen de resistencia a la ampicilina;

35 - pUC (ori): origen de replicación bacteriana;

- Lac(F): gen que codifica la enzima III lactosa-específica de *S. aureus*;

40 - 3'PB TR: elemento de recombinación homóloga 3' del sistema PiggyBac;

- Aislante de núcleo: "Aislante de núcleo del sitio 4 de hipersensibilidad de pollo (chicken hypersensitivity site 4 core insulator";

45 - SV40-polyA: "Poli-Adenosina del virus de simio 40" (Simian virus 40 Poly-Adenosine);

- WPRE: "Elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota" (Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element";

50 - PuroR: gen de resistencia a la puromicina;

- EF1A: promotor de EF1A;

- Nanoluciferasa: gen de la nanoluciferasa;

55 - CMV: promotor de CMV

- 5'PB TR: elemento de recombinación homóloga 5' del sistema PiggyBac;

- PiggyBac: gen de PiggyBac.

60 Varias líneas de células diana han sufrido esta transformación genética: la línea Raji, la línea SKOV3 y una línea CHO que expresa TNF-alfa humano.

65 Después de la transformación de las células diana seleccionadas, éstas se cultivan en condiciones adecuadas (generalmente, para unas células de mamíferos, la temperatura es de $37\pm 2^\circ\text{C}$ en una atmósfera humidificada que contiene entre el 5 y el 10% de CO_2) en un medio de cultivo adecuado para el tipo celular seleccionado que contiene

el antibiótico de selección cuyo gen de resistencia se ha introducido en el vector de expresión (la puromicina en el ejemplo presentado en la figura 5). Este antibiótico permite seleccionar las células efectivamente transformadas al no permitir el crecimiento de las células para las cuales no ha funcionado la transformación genética. Un cultivo largo (algunas semanas) permite obtener una mezcla de células que han integrado todas de manera estable el transgén en su ADN.

Aunque no es indispensable para la realización de la presente invención, se recomienda proceder después a una etapa de clonación de estas mezclas celulares. Esto permite obtener una línea de células diana que expresa la nanoluciferasa y procedente de una sola célula (o clon), lo que favorece la homogeneidad y la reproducibilidad de los resultados del ensayo de citotoxicidad.

A fin de garantizar la estabilidad y la perennidad del suministro de células diana transformadas, es preferible producir un banco de estas células en unas condiciones que permiten su crecimiento estáticamente o bajo agitación en contenedores adecuados. Por ejemplo, para producir los bancos celulares que han permitido confirmar la validez del procedimiento de la presente invención, las células se cultivaron estáticamente en frascos tratados para cultivo celular, a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo atmósfera húmeda a $5 \pm 1\%$ de CO_2 y en medio adecuado: RPMI-1640 que contiene un 10% de suero fetal de ternera (SVF) y 0,25 g/ml de puromicina para la línea Raji; en medio McCoy 5A, un 10% SVF y 5 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina para las células SKOV3; en medio F12-Ham, un 10% SVF, 1 mg/ml G418 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina para las células CHO. Después del crecimiento de una cantidad suficiente de células, éstas se reparten en contenedores adecuados y se congelan según las técnicas habituales a las células eucariotas para su crioconservación.

La figura 4 ilustra el tipo de señal que es posible obtener con tales células diana (las células CHO que expresan el TNF-alfa en este ejemplo) que expresa la nanoluciferasa después de la transformación genética. Estos resultados muestran, por un lado, que la señal generada por la nanoluciferasa libre en solución (después de la producción por las células) es perfectamente lineal entre 10^1 y 10^6 unidades de luminiscencia (RLU). Muestran, por otro lado, que la relación entre la señal máxima (después de la lisis de las células con un detergente) y la liberación espontánea es todavía al menos igual a 2 en las condiciones ensayadas, y se estabiliza alrededor de 6 cuando el número de células por pocillo está comprendido entre 250 y 5000 células. La cantidad de células diana utilizadas en los ensayos presentados a continuación está, por lo tanto, comprendida en este intervalo. Las condiciones de utilización y la sensibilidad de este sistema permiten, por lo tanto, una gran flexibilidad en la realización del ensayo. El número muy bajo de células necesarias para la obtención de una señal satisfactoria es particularmente destacable cuando se compara con la cantidad de células que necesitan las técnicas de la técnica anterior (véase la tabla 1 que compara los rendimientos de los diferentes métodos de medición específicos de la lisis directa [técnica anterior y diferentes ejemplos de la invención descritos a continuación con la nanoluciferasa]).

Tabla 1

Método	Proporción Señal/ruido	Cantidad necesaria de células	Radio-activo	Sensibilidad	Reproducibilidad	Capacidad de análisis de alta velocidad
Cromo ^{51}Cr	5-12	2500 a 10000	+	+	+	+
Calceína-AM	2,5	2500 a 10000	-	-/+	-/+	+
$\text{Eu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$	1-3	5000 a 10000	-	-/+	-/+	+
Citometría de flujo	NA	1000 a 5000	-	+	-/+	-
Beta-galactosidasa	≈ 30	2×10^5	-	-/+	Ningún dato disponible	+
Nanoluciferasa (presente invención)	4-12	250 a 5000	-	+	+	+

Leyenda. "NA": no aplicable; "+": sí; "-": no; "-/+": débil.

Entre los métodos de la técnica anterior: el método actual de referencia es el método con cromo ^{51}Cr , los métodos calceína-AM y $\text{Eu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ son poco sensibles y variables según el tipo celular, y el método de la beta-galactosidasa subestima en un 30-40% la proporción de células muertas.

Realización del ensayo o ensayo de citotoxicidad según la invención:

Las células diana preparadas como se ha descrito anteriormente son puestas en forma de una suspensión homogénea y contadas mediante cualquier método adecuado. La cantidad de células necesaria para la realización del ensayo se deposita en un tubo de centrifugación y el medio de cultivo se elimina por centrifugación entre 1 y 30 minutos a una aceleración de 100 g a 1500 g. Preferentemente, esta centrifugación se realiza clásicamente entre 120 g y 600 g durante 5 a 10 minutos, el medio de cultivo sobrenadante se elimina y las células se recogen en un

medio de cultivo nuevo (preferentemente que no contiene el o los antibióticos de selección) a la concentración deseada para la realización del ensayo final.

El ensayo de citotoxicidad se puede realizar en cualquier tipo de contenedores (tubos o placas) que permite mantener unas células eucariotas vivas durante algunas horas, especialmente unas placas multipocillos de 96 o 384 pocillos de fondo plano, cónico o circular. Cada pocillo de ensayo contiene una mezcla que incluye la cantidad de células diana seleccionada, el producto cuya acción terapéutica/citolítica debe ensayarse y, si tiene lugar, un sistema efector complementario tal como unas células citotóxicas (en el caso de un ensayo de tipo ADCC o reacción linfocitaria mixta por ejemplo) o una fuente de complemento (en el caso de un ensayo de CDC o similar). En la base de los datos presentados en la figura 4, la cantidad de células diana por pocillo estará comprendida entre 10 y 10000, preferentemente entre 200 y 3000.

La sustancia activa se ensaya utilizando diferentes concentraciones de esta, una sola concentración por pocillo. Cuando un sistema efector (de tipo efectores o fuente de complemento) es necesario, la sustancia a ensayar puede añadirse a las células diana o bien simultáneamente, o bien antes de la adición del sistema efector, respetando un tiempo de pre-incubación variable, preferentemente comprendido entre 5 y 60 minutos. Se podrán utilizar varios tubos o pocillos con unas condiciones estrictamente similares a fin de realizar varios "replicados".

En el caso de un ensayo de ADCC o de reacción linfocitaria mixta, la proporción entre las cantidades de células efectoras y de células diana está preferentemente comprendido entre 0,1 y 200. Las células efectoras pueden ser cualquier célula capaz de ejercer una actividad citotóxica frente a la línea diana seleccionada, tales como unas células NK, unos linfocitos T, unos monocitos, unos macrófagos o unos polinucleares, primarios o inmortalizados, no modificadas o transformadas genéticamente. Esta actividad citotóxica podrá ser natural (es decir que se inicia directamente cuando las células diana y las células efectoras entran en contacto) o inducida por una sustancia activadora, que podrá ser o no la sustancia a ensayar (soluciones de anticuerpos monoclonales, policlonales o moléculas emparentadas, moléculas pro-citotóxicas, citoquinas, hormonas, neurotransmisores, etc.). Las células efectoras, en cultivo o que provienen de una ampolla procedente de un banco celular descongelado extemporáneamente, se cuentan, por lo tanto, mediante cualquier método adecuado. La cantidad de células necesarias para la realización del ensayo se deposita entonces en un tubo de centrifugación y el medio de cultivo se elimina por centrifugación entre 1 y 30 minutos con una aceleración de 100 g a 1500 g, preferentemente entre 120 g y 600 g durante 5 a 10 minutos. El medio de cultivo sobrenadante se elimina después y las células se recogen en un medio de cultivo nuevo (preferentemente el mismo que para las células diana) a la concentración deseada para la realización del ensayo final. Esta concentración depende del número de células diana utilizadas por condición y de la proporción efecto/diana seleccionado.

En el caso en el que se busca la activación del complemento, se añade una fuente de complemento en los tubos o pocillos. Esta fuente de complemento puede ser un suero animal (por ejemplo procedente de bovinos, ovinos, caprinos, roedores, conejos, simios o seres humanos) o estar constituido de una mezcla de diferentes moléculas constitutivas del sistema del complemento purificadas y/o recombinantes. Puesto que el sistema del complemento se conserva muy bien durante la evolución, la especie de la cual proviene la fuente de complemento tiene poca importancia. Este sistema experimental está también apropiado para ensayar el efecto citolítico del suero en sí (sin la adición de anticuerpos exógenos), por ejemplo en los procesos de cribados de sueros auto-inmunes o vaccíneos. Globalmente, la proporción de suero o de la fuente de complemento puede representar del 0,1% al 100% del volumen de reacción total.

Alternativamente, el ensayo se puede realizar utilizando una concentración única de la sustancia citotóxica a ensayar, haciendo variar la cantidad de sistema efector en los pocillos (proporción efector/diana o cantidad de complemento por ejemplo), o una mezcla de 2 enfoques. Sea cual sea, el principio del ensayo sigue siendo el mismo.

Tras mezclar en los tubos o los pocillos las cantidades deseadas de células diana, de sustancia(s) a ensayar y/o de sistema(s) efector(es), los tubos o placas de cultivo se incuban entre 34°C y 40°C, preferentemente a 37°C±1°C, en una estufa o una incubadora. El tiempo de incubación puede ser variable en función del proceso estudiado. En el caso de fenómenos tales como ADCC o CDC, el tiempo de incubación estará generalmente comprendido entre 1 hora y 8 horas, y preferentemente entre 2 horas y 5 horas. En el caso de fenómenos de apoptosis o de efectos citotóxicos a largo plazo, la duración del ensayo puede extenderse de 8 horas a 72 horas, preferentemente entre 24h y 48h.

Al final del ensayo, se recupera el sobrenadante de cada pocillo. Preferentemente, y para asegurarse de que unas células no se extraerán, las placas o los tubos que contienen las células se centrifugan entre 10 s y 30 minutos a una aceleración de 100 g a 1500 g, preferentemente entre 30 y 120 s a una velocidad comprendida entre 200 g y 1000 g. Alternativamente, se puede realizar una etapa intermedia de extracción del sobrenadante directamente en los pocillos o los tubos de reacción, seguida de la transferencia de este sobrenadante en una placa o unos tubos nuevos y de su centrifugación en las condiciones anteriores. El volumen de sobrenadante necesario para la lectura se transfiere después en una placa adecuada para la lectura en un luminómetro, es decir opaco y de color blanco o negro, y mezclado con un sustrato de la nanoluciferasa. Estos sustratos son de la familia de la coelenterazina y de

5 sus análogos, y preferentemente de tipo furimazina disponible en el comercio de la compañía Promega bajo la referencia del producto “Nano-Glo[®] Luciferase Assay Substrate”. En función del tipo de placa utilizado, el sobrenadante se mezcla con el sustrato para un volumen final de reacción de 25 μ l a 340 μ l en placas de 96 pocillos estándar, de 15 μ l a 175 μ l para unas placas de 96 pocillos en formato “medio pocillo”, de 15 μ l a 100 μ l para unas placas de 384 pocillos estándares, de 4 μ l a 25 μ l para unas placas de 384 pocillos “de pequeño volumen”, de 3 μ l a 10 μ l para las placas de 1536 pocillos.

10 En función de las recomendaciones del proveedor y de los resultados presentados en la figura 6, el sustrato “Nano-Glo[®] Luciferase Assay Substrate” se diluye mediante mezcla con el sobrenadante (él mismo puro o diluido en función de la intensidad esperada de la señal y de manera dependiente del modelo celular) en una relación comprendida entre 1/50 (1 volumen de sustrato para 50 volúmenes de sobrenadante) y 1/1000, y preferentemente entre 1/100 y 1/200. Después de un tiempo de incubación mínimo de 3 minutos, la placa se lee en un luminómetro (por ejemplo modelo Mithras LB 940). El tiempo de adquisición de las señales es del orden de 0,05 segundos.

15 Como se demuestra en los ejemplos presentados a continuación, la intensidad de la señal luminosa es proporcional a la lisis de las células diana. La señal generada es fuerte, llevando a un método sensible, incluso con bajas cantidades de células diana (a partir de 250 células por pocillo). Los ejemplos siguientes muestran que el procedimiento según la invención basado en la medición de la liberación de nanoluciferasa presenta unas características y unos rendimientos muy comparables a los del ensayo actual de referencia basado en la liberación de ⁵¹Cr para la detección y la medición de la muerte celular (véase la tabla 2 en el ejemplo 10). Presenta no obstante la gran ventaja de evitar la utilización de elementos radioactivos, y por lo tanto todas las molestias y todos los riesgos relacionados con esta utilización, permitiendo al mismo tiempo un desarrollo de experimento más rápido ya que no necesita tiempo de marcado de las células diana. El principio de lectura por luminometría constituye además un método simple y económico, muy extendido en los laboratorios y que no necesita la compra de equipamiento costoso. Finalmente, su mecanismo de funcionamiento es muy similar al del ensayo con cromo y la medición es específica de la muerte de las células diana, incluso cuando éstas se mezclan con otros tipos de células cuya muerte no debe medirse.

30 El conjunto de estos datos demuestra que el ensayo de citotoxicidad basado en la liberación de nanoluciferasa presenta todas las características requeridas para convertirse en un ensayo de referencia, en particular a nivel industrial, para cualquier ensayo que necesite medir específicamente la muerte efectiva de una población celular dada. De manera no restringida, estos ensayos podrían evaluar el efecto citotóxico de polución o de contaminantes, de factores medioambientales y de medicamentos o drogas citotóxicas producidas por una síntesis química o por un sistema biológico y de cualquier otro elemento tóxico para una población celular dada.

35 **Ejemplo comparativo A:**

40 Tres líneas celulares diferentes se marcaron según el método del kit DELFIA BATDA (Perkin-Elmer), estrictamente según las recomendaciones del fabricante. Después, se incuban 10000 células por pocillo (3 pocillos por condición) durante 2 horas a 37°C en un medio de cultivo solo (RPMI [Roswell Park Memorial Institute] que contiene un 10% de suero fetal de ternera [SVF]) para determinar la liberación espontánea o en un medio de cultivo que contiene un 1% de detergente Tritón X-100 para determinar la liberación máxima (volumen final de los pocillos = 200 μ l). El ruido de fondo de determina sobre medio de cultivo solo, sin célula ni Tritón 100. Al final de la incubación, se transfieren 20 μ l de sobrenadante en unas placas específicas (proporcionadas en el kit) y se añaden 200 μ l de solución de europio.

45 Después de 15 minutos de incubación, las señales se leen mediante el método TRF sobre un lector adecuado (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Thoiry, Francia). En la figura 1A se presentan los valores absolutos medidos para los diferentes parámetros en recuento por segundo para las diferentes líneas. La figura 1B representa las proporciones entre la señal máxima y el ruido de fondo (barras blancas), por un lado, o la señal espontánea (barras negras) por otro lado. Esta figura muestra los resultados de un experimento representativo de

50 aproximadamente diez experimentos durante los cuales se intentaron sin éxito diferentes enfoques de optimización de la intensidad de la señal, con unas proporciones señal/ruido todavía inferiores a 3.

55 **Ejemplo comparativo B:**

Se ensayó por los inventores una primera molécula informadora artificial, combinando dos unidades antigénicas específicas distintas (denominadas “flags”), reconocidas cada una por un anticuerpo que lleva, para uno de ellos, un lanfánido donante de energía y, para el otro, un receptor de energía. El conjunto representa una proteína de un peso de 47 kDa. La presencia de la molécula liberada se detecta por adición de dos anticuerpos simultáneamente en el sobrenadante. Si la molécula libre está presente, los dos anticuerpos se fijan en ella, encontrándose así cerca el uno del otro, lo que permite la transferencia de energía y la emisión de una señal de tipo TR-FRET.

En el ejemplo, unas células diana SKBR3 que expresan esta molécula informadora se incuban durante 4 horas a 37°C en placa de 96 pocillos en presencia de concentraciones crecientes (indicadas en las abscisas) de trastuzumab y de células citotóxicas (linfocitos T que expresa el receptor CD16). Al final de las 4 horas de incubación, los

anticuerpos de revelación se añaden al medio y la señal TR-FRET se lee en fluorimetría sobre el lector Mithras LB 940 (Berthold) (desplazamiento de lectura de 300 μ s, proporción 665/620 nm).

En paralelo, se marca una fracción de las mismas células SKBR3 que expresan la molécula informadora con ^{51}Cr (100 $\mu\text{Ci}/10^6$ células). El resto de las condiciones experimentales es estrictamente idéntico: número de células diana (3000) y de células efectoras (30000) por pocillo, medio de cultivo (RPMI y un 10% de suero fetal de ternera), dos pocillos en duplicado para cada concentración ensayada, 4 horas de incubación a 37°C. Al final de la incubación, se recupera el sobrenadante, se transfiere en unas placas de centelleo (Lumaplate, Perkin-Elmer) y se leen en un contador de centelleo (Microbeta Jet, Perkin-Elmer).

Los resultados, presentados en la figura 2, se expresan en porcentaje de lisis específica, calculados según la fórmula:

$$\frac{\text{Señal (X)} - \text{Señal espontánea}}{\text{Señal máxima} - \text{Señal espontánea}}$$

en la que “señal (X) es la señal obtenida para un pocillo x dado, “señal máxima” es la señal obtenida cuando las células se lisan por un 0,75% de Tritón X-100 y “señal espontánea” es la señal obtenida cuando las células se incuban simplemente en presencia de medio de cultivo solo (sin anticuerpo ni células efectoras). El gráfico muestra, en las ordenadas, la lisis específica media \pm desviación estándar para cada concentración ensayada según los dos métodos, en ^{51}Cr (círculos negros y línea continua) o TR-FRET (triángulos negros y línea de puntos). Los resultados presentados en la figura 2 se refieren a un experimento representativo de dos.

Estos resultados muestran la ineficacia de la molécula informadora para ser representativa de la lisis de las células diana tal como se observa por el método con ^{51}Cr . Los controles positivos (no mostrados) son, por otro lado, satisfactorios, el método de detección en sí no se puede cuestionar. La molécula informadora se retiene, por lo tanto, probablemente en el citoplasma de las células diana y no se liberan durante la lisis. El tamaño importante de la molécula (47 kDa) es la hipótesis preferida para explicar esta retención citoplásmica.

Ejemplo comparativo C:

Otra proteína informadora, una GFP (“Proteína Fluorescente Verde”) recombinante de tamaño más pequeño que la presentada en el ejemplo comparativo B anterior (aproximadamente 27 kDa, y cuya presencia en el sobrenadante se puede medir por el uso de un anticuerpo acoplado a un lantánido (que efectúa una transferencia de energía TR-FRET hacia la GFP cuando está fijada a esta), se ha ensayado en este ejemplo comparativo.

Se ha utilizado una línea diana de células SKOV3 transformada genéticamente para expresar la GFP recombinante para estos ensayos, cuyos resultados se presentan en la figura 3. La parte de la izquierda (A) de la figura 3 muestra la expresión de la GFP medida por citometría de flujo sobre las células SKOV3 salvajes (wt) no transformadas, arriba, o por las células SKOV3 transformadas (GFP-positivas), abajo. La expresión de la GFP por las células transformadas corresponde aproximadamente a 1,5-Log, lo que es un nivel satisfactorio.

La parte de la derecha de la figura 3 (B) representa el ensayo en el que 30000 o 200000 células se han depositado por triplicado en unos pocillos de una placa de 96 pocillos y se han incubado en presencia de medio de cultivo único (RPMI que contiene un 10% de SVF) (liberación espontánea) o de medio de cultivo más un 0,75% de Tritón X-100 (liberación máxima). Al final de la incubación, el sobrenadante se extrae y se añade un anticuerpo anti-GFP acoplado con lantánido (Tb). La señal medida (lector Mithras LB 940, Berthold Technologies) es una señal TR-FRET del lantánido hacia la GFP (desplazamiento de lectura = 300 μ s, proporción 520/620 nm). La figura 3B representa la proporción entre la señal máxima y la señal espontánea para cada una de las dos cantidades de células, y es representativa de un experimento entre dos.

Los resultados muestran que, incluso con una cantidad importante de células diana por pocillo (3×10^4), la proporción máxima en espontáneo es sólo de 2, y que se necesita una cantidad considerable de células (2×10^5) para empezar a observar una proporción interesante (del orden de 4). Este método está por lo tanto muy lejos de los rendimientos del ^{51}Cr en materia de sensibilidad (como se ha evocado anteriormente, este se sitúa entre 8 y 12 con 3000 células por pocillos). De nuevo, el tamaño de la GFP y/o los mecanismos de su liberación durante la lisis de las células no son compatibles con una medición eficaz de la muerte celular.

Ejemplo 1: muestra la linealidad de la señal luminiscente y la influencia de la cantidad de células sobre esta señal.

Se ha medido la luminiscencia de un sobrenadante que contiene la nanoluciferasa, después de la lisis con Tritón X-100, diluido en serie entre 1/1 y 1/10000. Se mezclan 25 μ l de cada dilución con 25 μ l de sustrato Nano-Glo® (Promega) en una placa de 96 pocillos “medios pocillos” antes de la lectura con luminómetro (Mithras LB 940, Berthold Technologies, tiempo de adquisición de 0,05 s). Se realiza una regresión lineal de los valores obtenidos (véase la figura 4A: intensidad de la señal luminiscente obtenida, expresada en RLU (Unidad de luminiscencia

relativa) en función de la dilución). Se constata por un lado que esta señal es lineal (coeficiente de regresión $R^2 = 0,9997$) sobre toda la gama de medición y se extiende aproximadamente de 10 a 10^6 unidades arbitrarias de luminiscencia sobre el lector utilizado.

5 Por otro lado, la linealidad de las señales de liberación espontánea y máxima de células CHO-K1 que expresan la nanoluciferasa se ha evaluado incubando durante 4 h unas cantidades variables de células diana (10000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 células por pocillo) en presencia de medio único (espontáneo) o de un 0,25% de Tritón X-100 (máximo). Se extraen entonces 25 μ l de sobrenadante y se mezclan con 25 μ l de sustrato Nano-Glo[®] antes de la lectura con luminómetro (tiempo de adquisición de 0,05 s). Los resultados se presentan en la figura 4B.
10 El eje de las abscisas muestra el número de células por pocillo y el eje de las ordenadas de la izquierda representa la señal luminiscente obtenida en las condiciones espontánea (círculos negros) y máxima (cuadrados negros). Se realiza una regresión lineal para cada una de estas dos series de puntos y se representa en el gráfico (respectivamente línea con puntos anchos y línea continua), así como el factor de correlación (R^2) asociado, que muestra una muy buena relación lineal entre estos parámetros. Para cada cantidad de células, la proporción entre
15 señal máxima y señal espontánea se calcula y se representa por un triángulo blanco sobre el eje de las ordenadas de la derecha, estando cada punto unido por una línea de puntos finos para facilitar la lectura.

El conjunto de estos datos demuestra la viabilidad de este método, que resulta sensible (25 células por pocillo son suficientes para obtener una señal satisfactoria), lineal en una amplia gama de cantidad de células y de luminiscencia (todos los factores de regresión analizados son superiores a 0,94), y flexible de uso (la proporción [liberación máxima]/[liberación espontánea] sigue constante, entre 250 y 2500 células por pocillo).

Ejemplo 2: muestra la relación lineal entre la intensidad de la señal luminiscente y el número de células efectivamente muertas durante un ensayo de citotoxicidad.

25 Se ha realizado un ensayo de lisis por el complemento sobre unas células Raji (que expresan la nanoluciferasa) en presencia de un anticuerpo terapéutico anti-CD20 disponible en el comercio, el MabThera[®] (INN: rituximab).

Estas células Raji que expresan la nanoluciferasa se incuban 4h a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo plano (3000 células por pocillos) en medio RPMI-1640, de cantidades variables de anticuerpos anti-CD20 (MabThera, Roche, gama de 9 concentraciones de 1093,5 a 0,167 ng/ml por paso de dilución de 1/3), y de 1 CH₅₀ ("complemento hemolítico 50", unidad de medición habitual de la actividad del complemento) de complemento de cobaya (Sigma-Aldrich). Se realizan también unas condiciones control que permiten medir la liberación espontánea (3000 células diana en RPMI-1640, 1 CH₅₀ de complemento de cobaya y 1093,5 ng/ml de un anticuerpo que no se fija a las células Raji, el Herceptin[®]) y la liberación máxima de nanoluciferasa en presencia de 0,01% de Tritón X-100. Cada condición de realización se realiza en triplicado. Al final de la incubación, 25 μ l de sobrenadante se recuperan en cada pocillo, mezclados a 25 μ l de sustrato Nano-Glo[®] diluido al 1/50 en PBS, incubados durante 3 minutos y leídos con luminómetro.

40 El porcentaje de lisis específica obtenida para cada concentración X se calcula a partir de las mediciones de luminiscencia (en RLU) según la fórmula: $(RLU(X)-RLU(\text{espontánea})) / (RLU(\text{max})-RLU(\text{espontánea})) \times 100$.

Después de la extracción del sobrenadante, el resto de las células se vuelve a poner en suspensión, se mezcla extemporáneamente con 0,25 μ m final del marcador vital TO-PRO-3 (Life Technologies) y analizado por citometría de flujo a fin de determinar el porcentaje de mortalidad (es decir el porcentaje de células marcadas con TO-PRO-3). La figura 7 presenta los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones de MabThera[®]. Cada punto representa la media de los triplicados, las barras verticales y horizontales representan la desviación estándar. La recta teórica $y = x$ se representa por una línea de puntos. Los resultados muestran que la recta de regresión tiene una pendiente de $1,08 \pm 0,10$, una ordenada al origen de $3,01 \pm 4,21$ y un coeficiente de regresión lineal de 0,8242. Estos resultados muestran una relación proporcional y lineal satisfactoria entre los dos métodos de medición de la citólisis, lo que permite confirmar que el fenómeno de lisis medido por el método de la nanoluciferasa se traduce bien funcionalmente por una muerte efectiva de las células a nivel biológico.

Ejemplo 3:

55 La figura 8, en la que la lisis específica de células adherentes (SKOV3) o no adherentes (Raji) que expresan la nanoluciferasa se ha medido en un ensayo de ADCC según la presente invención, muestra el carácter dinámico de dicho método.

60 Unas células diana no adherentes (Raji) o adherentes (SKOV3) transformadas para expresar establemente la nanoluciferasa se incubaron (a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂), en placas de 96 pocillos de fondos planos tratados para cultivo celular (3000 células diana por pocillo), en presencia de concentraciones crecientes (cuyos logaritmos se indican en las abscisas) del anticuerpo correspondiente (rituximab [MabThera[®]] o trastuzumab [Herceptin[®]], respectivamente) y de células efectoras citotóxicas (linfocitos T que expresan CD16, 30000 células efectoras por pocillo) en RPMI-1640 suplementado con un 5% de SVF. Cada gama se deposita 4
65

veces (para las 4 duraciones de incubación ensayadas) con 3 pocillos por condición (triplicado). Después de 1 (círculos negros), 2 (cuadrados negros), 3 (rombos blancos) o 4 (triángulos negros) horas de incubación, se recuperan 25 µl de sobrenadante en los pocillos correspondientes, transferidos en una placa de “medio pocillo” blanca, mezclados a 25 µl de sustrato NanoGlo® diluido al 1/50 en D-PBS, incubados 3 minutos y leídos sobre un luminómetro Mithras LB940. El porcentaje de lisis específica obtenido para cada concentración X se calcula a partir de las mediciones de luminiscencia (en RLU) según la fórmula $(RLU(X) - RLU(\text{espontánea})) / (RLU(\text{max}) - RLU(\text{espontánea})) \times 100$, obteniéndose las condiciones máxima y espontánea por incubación de las mismas células en un medio que contiene un anticuerpo irrelevante (3000 ng/ml de trastuzumab o 5000 ng/ml de rituximab, respectivamente, para constituir la medición de la liberación espontánea) y un 0,01% de Tritón X-100 (liberación máxima). Los porcentajes de lisis específicos se representan en las ordenadas, representando cada punto la media del triplicado y representando las barras verticales su desviación estándar. Los datos se modelaron después con la ayuda de una regresión sigmoïdal a 4 parámetros utilizando el programa GraphPad Prism.

Se observa un aumento gradual de la cantidad de células lisadas, concomitante por un lado con el aumento de la concentración en agente citolítico (el anticuerpo terapéutico) y por otro lado con el tiempo de incubación. En los dos modelos, 1 y 2 horas son unos tiempos demasiado cortos para observar el efecto lítico máximo mientras que 3 y 4 horas muestran una saturación del fenómeno de citotoxicidad. En este último caso, un tiempo de incubación superior a 3h no permite obtener una lisis más elevada de las células diana. El presente método es por lo tanto además capaz de evaluar los aspectos cinéticos de la citólisis.

Ejemplo 4:

A fin de evaluar sus rendimientos en condiciones estrictamente comparables, los métodos de ^{51}Cr y de la nanoluciferasa se han comparado en paralelo en un mismo ensayo de ADCC específico de la molécula CD20, repetido 3 veces de manera independiente (realizándose uno de los ensayos por un segundo operario). Las mismas células Raji que expresan la nanoluciferasa se han marcado o no con ^{51}Cr y utilizadas en paralelo en el ensayo.

Unas células diana Raji transformadas para expresar establemente la nanoluciferasa se incubaron o no durante 1 hora en una solución salina de Na_2CrO_4 equivalente a 100 µCi de ^{51}Cr por millón de células, después se lavaron 4 veces por RPMI-1640, un 10% SVF y se contaron. Las células (3000 por pocillo), marcadas o no con ^{51}Cr , se incubaron después a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 , en placas de 96 pocillos de fondos planos tratadas para el cultivo celular, en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo rituximab (MabThera®) y de células efectoras citotóxicas (linfocitos T que expresan CD16, 30000 células por pocillo) en RPMI-1640 suplementado con un 5% de SVF.

Después de 4 horas de incubación, el porcentaje de lisis específico se mide según el método correspondiente (liberación de ^{51}Cr o de nanoluciferasa según si las células se han marcado con cromo o no): se recuperan 25 µl de sobrenadante de células marcadas con ^{51}Cr y se depositan sobre una placa Lumaplate® (Perkin Elmer). En el mismo instante, para las células no marcadas con ^{51}Cr , se recuperan 25 µl de sobrenadante en cada pocillo, se transfieren en placas de 96 “medios pocillos” blancos, se mezclan con 25 µl de sustrato NanoGlo® diluido al 1/50 en D-PBS, se incuban durante 3 minutos y se leen sobre un luminómetro Mithras LB940 (Berthold Technologies). Después de una noche de secado, la radioactividad de los sobrenadantes depositados en Lumaplate® se mide en un contador Microbeta-Jet (Perkin Elmer) y se expresa en CCPM (“corrected count per minute”) después de la normalización de los detectores.

El porcentaje de lisis específico obtenido para cada concentración X se calcula de la misma manera para los dos tipos de métodos, a partir de las mediciones de radioactividad (en CCPM) o de luminiscencia (en RLU) según la fórmula $\frac{CCPM/RLU(X) - CCPM/RLU(\text{espontáneo})}{CCPM/RLU(\text{max}) - CCPM/RLU(\text{espontáneo})} \times 100$. En los dos casos, las condiciones máxima y espontánea se obtuvieron por incubación de las mismas células en un medio que contiene 3000 ng/ml de trastuzumab sustituyendo el rituximab (liberación espontánea) y un 0,01% de Tritón X-100 (en el caso de la liberación máxima únicamente). Los porcentajes de lisis específicos se representan en la figura 9 en las ordenadas, representando cada punto la media de las nueve determinaciones (3 replicados en 3 experimentos independientes) y representando las barras verticales las desviaciones estándares. Los datos se modelizaron con la ayuda de una regresión sigmoïdal de 4 parámetros utilizando el programa GraphPad Prism.

Esta modelización permite calcular cuatro tamaños característicos de la curva: los porcentajes de lisis mínima (Emin) y máxima (Emax), la pendiente de la parte lineal y la concentración de anticuerpos necesaria para obtener un 50% de Emax (EC₅₀). Se ha evaluado la capacidad de los dos métodos para detectar unas muestras cuya actividad ADCC estaría ligeramente modificada con respecto a una muestra de referencia (lo que constituye la base de una medición de potencia) gracias a la utilización de gamas de anticuerpos cuyas concentraciones se desplazan un 80% o un 125% con respecto a la gama de referencia (denominada “100%”). La potencia de las gamas diluidas a un x% se calcula según la fórmula: $(EC_{50}[100\%]) / (EC_{50}[X\%]) \times 100$. Este enfoque permite también evaluar la precisión del método según los criterios de ICH-Q2(R1).

Los resultados generales de estos tres experimentos se ilustran en la figura 9, que muestra los porcentajes de lisis específica obtenidos (media \pm desviación estándar de los 3 experimentos) y las modelizaciones resultantes para la gama 100%. Muestran una muy buena reproducibilidad de los dos métodos (las desviaciones estándares para una misma condición son poco elevadas) así como un perfil de resultados muy similar entre los dos métodos (las dos curvas son casi superponibles).

Para impulsar más en el análisis, se ha analizado la dispersión de los Emin y Emax calculados para cada serie de datos, para las 3 gamas y en los 3 experimentos. Los resultados se presentan en la figura 10 (en la que cada punto corresponde al valor medido para un experimento, representando la línea horizontal para cada serie de valores la media aritmética de la serie considerada). Las dispersiones son totalmente satisfactorias, con unos valores medios (Emin y Emax, \pm desviación estándar) de $1,0 \pm 1,5\%$ y $75,7 \pm 6,0\%$ para ^{51}Cr y de $1,2 \pm 1,2\%$ y $73,6 \pm 8,4\%$ para la nanoluciferasa. Estos resultados muestran que Emin y Emax son constantes y reproducibles entre los ensayos, incluso cuando se utilizan unas gamas de concentración del 80% y del 125% además de la gama estándar.

De la misma manera, el análisis de la dispersión de los EC₅₀ de las gamas 100% [figura 11: cada punto representa el valor de EC₅₀ obtenido en un experimento utilizando o bien la medición de la nanoluciferasa liberada (círculos negros) o bien la del cromo-51 (cuadrados blancos), representando la línea horizontal la media aritmética de los 3 valores] muestra unos resultados muy satisfactorios para los dos métodos y un valor medio ligeramente más bajo para el método por luminiscencia: $55,2 \pm 15,6$ ng/ml para el ^{51}Cr y $31,8 \pm 7,3$ ng/ml para la nanoluciferasa (medias \pm desviación estándar), es decir unos coeficientes de variación (CV) del 28,3% y del 22,8% respectivamente.

Finalmente, la potencia se calcula para cada experimento independiente como la proporción (expresada en porcentajes) entre EC₅₀ de la muestra de referencia (aquí la gama estándar 100%) y EC₅₀ de la muestra a ensayar (aquí las gamas del 80 y del 125%). Los resultados se representan en la figura 12: la potencia calculada se detalla en las ordenadas para los dos métodos nanoluciferasa (círculos negros) y cromo-51 (cuadrados blancos), la línea horizontal (continua para el método nanoluciferasa y de puntos gruesos para el método ^{51}Cr) representa la media aritmética de las 3 mediciones. Las líneas de puntos finos indican las potencias teóricas ideales del 80% y del 125%).

Los resultados muestran otra vez una dispersión comparable de las mediciones entre los dos métodos y unos resultados conformes a los esperados. En efecto, los valores medios (\pm desviación estándar) para las gamas del 80% y del 125% son de $76,7 \pm 10\%$ (CV = 14,2%) y $131,9 \pm 11,9\%$ (CV = 9,1%) para el método ^{51}Cr y de $83,6 \pm 22\%$ (CV = 26,4%) y $119,5 \pm 22,7\%$ (CV = 19,0%) para el método nanoluciferasa.

Estos resultados demuestran la pertinencia del método basado en la liberación de la nanoluciferasa en el modelo de ADCC anti-CD20 descrito aquí, cuyos rendimientos son totalmente comparables con los del método de referencia con ^{51}Cr .

Ejemplo 5:

Utilizando el mismo tipo de células diana que el del ejemplo 4, el método nanoluciferasa se ha comparado con el método con ^{51}Cr en un ensayo de CDC anti-CD20. La metodología aplicada fue la misma que la descrita en el ejemplo 4, estando el sistema citolítico constituido por una fuente de complemento. De la misma manera, se ha utilizado una gama estándar de anticuerpo (rituximab), así como gamas de concentraciones modificadas al 80% y al 125%. Se han realizado tres experimentos independientes, de los cuales uno se realiza por un segundo operario.

La figura 13 muestra la comparación de las curvas sigmoides obtenidas a partir de los valores medios procedentes de los 3 experimentos. Las desviaciones estándares son satisfactorias y las curvas son totalmente similares en su aspecto, a pesar de un ligero desplazamiento de los EC₅₀.

El análisis preciso de los E_{min} y de los E_{max} (Figura 14) confirma la similitud de estos parámetros, con $3,0 \pm 3,4\%$ y $88,6 \pm 7,8\%$ para ^{51}Cr y $-0,3 \pm 3,2\%$ y $95,6 \pm 7,0\%$ para la nanoluciferasa, respectivamente (media \pm desviación estándar) para el conjunto de las gamas del 80, el 100 y el 125%.

El análisis de la dispersión de los EC₅₀ para la gama del 100% en los 3 experimentos (Figura 15) da también unos resultados satisfactorios con un valor medio (\pm desviación estándar) de $156,7 \pm 30,1$ ng/ml (CV = 19,2%) para ^{51}Cr y de $73,1 \pm 9,9$ ng/ml (CV = 13,5%) para la nanoluciferasa.

Finalmente, el cálculo de las potencias (Figura 16) permite constatar unos rendimientos similares entre los dos métodos, con unos valores (medias \pm desviaciones estándares) muy comparables para la gama del 80% ($69,6 \pm 12,3\%$ para ^{51}Cr y $65,0 \pm 12,9\%$ para la nanoluciferasa, CV = 17,7% y 19,8% respectivamente) y una mejor precisión con la gama del 125% para el método nanoluciferasa a pesar de una precisión un poco peor ($105,8 \pm 8,2\%$ [CV = 7,7%], frente a $131,5 \pm 16,4\%$ [CV = 12,4%] para ^{51}Cr).

Estos resultados demuestran la pertinencia del método basado en la liberación de la nanoluciferasa en el modelo de CDC anti-CD20 descrito aquí, cuyos rendimientos son muy comparables a los del método de referencia con ^{51}Cr .

Ejemplo 6:

El método nanoluciferasa se ha comparado con el método con ^{51}Cr en un ensayo de ADCC anti-HER2. Para ello, unas células SKOV3 que expresan establemente la nanoluciferasa se marcaron o no con ^{51}Cr y se utilizaron simultáneamente en un ensayo de ADCC en las mismas condiciones experimentales, según el mismo principio que aquel descrito en el ejemplo 4.

Se incubaron o no unas células diana SKOV3 transformadas para expresar establemente la nanoluciferasa durante 1 hora en una solución salina de Na_2CrO_4 (Perkin Elmer, Francia), equivalente a $100 \mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr por millón de células, después se lavaron 4 veces con RPMI-1640, 10% SVF y se contaron. Las células (3000 por pocillo), marcadas o no con ^{51}Cr , se incubaron después a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 en placas de 96 pocillos de fondos planos tratadas para el cultivo celular, en presencia de concentraciones crecientes (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 5000 ng/ml, cuyos logaritmos se indican en las abscisas) del anticuerpo trastuzumab (Herceptine[®]) y de células efectoras citotóxicas (linfocitos T que expresan CD16, 30000 células por pocillo) en RPMI-1640 suplementado con un 5% de SVF.

Al final de la incubación de 4 horas, se recuperan 25 μl de sobrenadante de cada condición, se mide la citólisis y se calcula el porcentaje de lisis específica según unas modalidades estrictamente idénticas a las descritas en el ejemplo 4.

Se utilizaron una gama estándar (100%) de trastuzumab así como unas variaciones al 80% y al 125% de esta gama, se repitió el experimento 3 veces de manera independiente, de las cuales una se realiza por un segundo operario. Los porcentajes de lisis específica medios obtenidos por los dos métodos en los tres experimentos, así como las modelizaciones asociadas se muestran en la figura 17. De nuevo, los dos métodos dan unos resultados muy similares, con una dispersión de los valores que parece más baja para el método nanoluciferasa.

Estos datos se confirman mediante el análisis de lisis mínimas y máximas (figura 18: cada punto corresponde al valor medido para un experimento, representando la línea horizontal para cada serie de valores la media aritmética de la serie considerada), que muestra unos valores (medias \pm desviaciones estándares) de E_{\min} y de E_{\max} de $0,5 \pm 2,2\%$ y $41,3 \pm 4,3\%$ para ^{51}Cr y de $0,3 \pm 0,7\%$ y $34,1 \pm 4,3\%$ para la nanoluciferasa, respectivamente.

El análisis de EC_{50} (figura 19: cada punto representa el valor de EC_{50} obtenido en un experimento), representando la línea horizontal la media aritmética de los 3 valores) confirma la más baja dispersión obtenida en este modelo gracias al método nanoluciferasa. Así, EC_{50} medio (\pm desviación estándar) para la gama estándar es de $181,6 \pm 8,0$ ng/ml en nanoluciferasa ($\text{CV} = 4,4\%$) mientras que es de $402,5 \pm 172,5$ ng/ml para ^{51}Cr , es decir un CV de 42,8%.

A pesar de esta dispersión más elevada de los EC_{50} entre los experimentos para el método con cromo, el análisis de las potencias (que se calculan experimento por experimento dividiendo el EC_{50} de la gama estándar por el de la gama modificada) no muestra diferencia significativa de rendimiento entre los dos métodos (figura 20). En esta figura 20, la línea horizontal (continua para el método nanoluciferasa y de puntos gruesos para el método ^{51}Cr) representa la media aritmética de tres mediciones. Las líneas de puntos finos indican las potencias teóricas ideales del 80% y del 125%. La potencia media (\pm desviación estándar) calculada para las gamas del 80% y del 125% es de $82,9 \pm 13,0\%$ ($\text{CV} = 15,7\%$) y $154,2 \pm 24,8\%$ ($\text{CV} = 16,1\%$) para el método con ^{51}Cr y de $69,3 \pm 7,9\%$ ($\text{CV} = 11,4\%$) y $136,9 \pm 19,4\%$ ($\text{CV} = 14,2\%$) para el método nanoluciferasa, respectivamente.

El conjunto de estos resultados demuestra la utilidad del método nanoluciferasa sustituyendo el método con ^{51}Cr en este modelo de ADCC anti-HER2.

Ejemplo 7:

El método de medición de liberación de la nanoluciferasa se ha comparado con el método con cromo en un tercer modelo, el del anticuerpo anti-TNF-alfa adalimumab (Humira[®]). El presente ejemplo ilustra su utilización en un ensayo de medición de la actividad CDC. Para ello, unas células CHO previamente transformadas y seleccionadas para expresar el TNF-alfa humano en su forma membranaria se han transformado para expresar establemente la nanoluciferasa. La metodología seguida después es comparable a la descrita en el ejemplo 5. Brevemente, estas células, marcadas o no con ^{51}Cr , se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de adalimumab (Humira[®]) y de una fuente de complemento (de cobaya (Sigma)). La lisis específica se midió después mediante el método adecuado (liberación del cromo o de la nanoluciferasa).

El porcentaje de lisis específico para cada concentración X se calcula de la misma manera para los dos tipos de métodos, a partir de las mediciones de radioactividad (en CCPM) o de luminiscencia (en RLU) según la fórmula

$$\frac{\text{CCPM}/\text{RLU}(X) - \text{CCPM}/\text{RLU}(\text{espontáneo})}{\text{CCPM}/\text{RLU}(\text{max}) - \text{CCPM}/\text{RLU}(\text{espontáneo})} \times 100.$$

En los dos casos, las condiciones máxima y espontánea se obtuvieron por incubación de las células en el mismo medio que contiene 8000 ng/ml de trastuzumab, sustituyendo el adalimumab (liberación espontánea) y un 0,01% de Tritón X-100 (en el caso de la liberación máxima únicamente). Los porcentajes de lisis específicos se representan en las ordenadas, representando cada punto (círculo negro para la nanoluciferasa y cuadrados blancos para el ^{51}Cr) la media de las nueve determinaciones (3 replicados en 3 experimentos independientes) y representando las barras verticales las desviaciones estándares. Los datos se modelizaron con la ayuda de una regresión sigmoideal de 4 parámetros utilizando el programa GraphPad Prism.

Los resultados medios obtenidos para los 3 experimentos se representan en la figura 21. Muestran aquí también una muy buena comparabilidad de los dos métodos, con unas curvas de aspectos y características muy parecidas (mesetas pendientes, EC_{50}).

El análisis de la dispersión de los E_{\min} y E_{\max} realizados confirma esta similitud (figura 22) con unos valores medios (\pm desviación estándar, sobre el conjunto de las gamas en los 3 experimentos) respectivos de $3,2 \pm 2,8\%$ y $50,4 \pm 5,6\%$ para el ^{51}Cr y de $0,9 \pm 1,5\%$ y $45,7 \pm 5,1\%$ para la nanoluciferasa.

El análisis de la dispersión de EC_{50} de los tres experimentos de CDC descritos en la figura 21 (figura 23) para las gamas estándar da aquí una igualdad casi perfecta entre los dos métodos, siendo los valores medios (\pm desviación estándar, media representada por una línea horizontal) de los 3 experimentos de $150,8 \pm 15$ ng/ml para el cromo ($\text{CV} = 9,9\%$) y de $156,9 \pm 23,4$ ng/ml para la nanoluciferasa ($\text{CV} = 14,9\%$).

Finalmente, el análisis de las potencias a través de las gamas del 80% y del 125% muestra también unos rendimientos comparables entre los dos métodos (Figura 24) con unas potencias medias (\pm desviación estándar) de $91,2 \pm 23,6\%$ ($\text{CV} = 25,8\%$) y $153,9 \pm 29,2\%$ ($\text{CV} = 19,0\%$) para el ^{51}Cr y de $83,4 \pm 10,1\%$ ($\text{CV} = 12,1\%$) y $131,7 \pm 47,2\%$ ($\text{CV} = 35,8\%$) para la nanoluciferasa (respectivamente para las gamas 80% y 125%).

Estos resultados demuestran que el método basado en la medición de la liberación de nanoluciferasa es equivalente en términos de resultados y de rendimientos al método de liberación del ^{51}Cr para la medición de la actividad CDC en un modelo anti-TNF-alfa.

Ejemplo 8:

Se ha comparado el método nanoluciferasa con el método con ^{51}Cr en un ensayo de ADCC anti-TNF-alfa. Para ello, se utilizaron las células CHO descritas en el ejemplo 7, que expresan establemente el TNF-alfa y la nanoluciferasa, así como una gama estándar de adalimumab y unas variaciones al 80% y al 125% de esta gama. Se realizaron tres experimentos independientes, siguiendo la misma metodología que en los ejemplos anteriores. A partir de los EC_{50} generados en los modelos de regresión sigmoideal a partir de los datos de lisis específica, se calcularon las potencias de las gamas del 80% y del 125% como anteriormente, y los resultados se presentan en la figura 25.

Los resultados son comparables entre los 2 métodos, con una ligera ventaja de dispersión de los valores para el método nanoluciferasa. En efecto, las potencias medias (\pm desviaciones estándares) de las gamas del 80% y del 125% calculadas son de $91,4 \pm 43,3\%$ ($\text{CV} = 47,4\%$) y $138,5 \pm 43,9\%$ ($\text{CV} = 31,7\%$) para el método ^{51}Cr y de $75,5 \pm 15,5\%$ ($\text{CV} = 20,6\%$) y $114,2 \pm 22,8\%$ ($\text{CV} = 19,9\%$) para la nanoluciferasa. Estos resultados demuestran la utilidad del método nanoluciferasa para medir la actividad ADCC de los anticuerpos anti-TNF-alfa en sustitución del método con ^{51}Cr .

Ejemplo 9:

Este ejemplo ilustra la adecuación entre el método nanoluciferasa y los fenómenos biológicos utilizados en los mecanismos de ADCC y de CDC. Para ello, se han realizado unas reacciones de ADCC y de CDC en paralelo y en las mismas condiciones experimentales, utilizando para la incubación unas placas de fondo plano o bien unas placas de fondo circular, favoreciendo estos últimos los contactos y las interacciones celulares gracias a la forma particular del pocillo. Los resultados se presentan en la figura 26.

Muestran que, en el caso del ensayo ADCC para el cual las interacciones entre células efectoras y diana son indispensables al efecto citotóxico, la forma del pocillo influye efectivamente el porcentaje de lisis máxima (un 38,1% de promedio para los fondos circulares frente al 27,6% para los fondos planos), sin que este fenómeno modifique significativamente los EC_{50} resultantes (59,8 ng/ml frente a 65,3 ng/ml, respectivamente). Por el contrario, la forma del pocillo no influye la reacción de CDC, con E_{\max} medios (47,0% en fondo circular y 44,6% en fondo plano) y unos EC_{50} medios (114,1 y 155,3 ng/ml, respectivamente) similares e independientes de la forma del pocillo.

Favorecer los contactos entre las células por una forma de pocillo adaptada permite por lo tanto claramente mejorar la cantidad de células diana lisadas por ADCC y detectadas por el método nanoluciferasa. De manera coherente, el ensayo de CDC, en el que la única población celular presente es la población de células diana y en el que el sistema efector es soluble (el complemento), es, por su parte, insensible a la forma del pocillo.

Ejemplo 10:

A fin de comparar los rendimientos del método de liberación de la nanoluciferasa con los del método de referencia por liberación de ^{51}Cr , los resultados de variabilidad presentados en los ejemplos 4 a 8 se han reunido en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

^{51}Cr				
Modelo	Ensayo	CV sobre EC50	CV sobre Potencia del 80% (e inclinación relativa)	CV sobre Potencia del 125% (e inclinación relativa)
CD20	ADCC	28,3%	14,2% (-4,1%)	26,4% (+4,5%)
	CDC	19,2%	17,7% (-13,0%)	12,4% (+5,2%)
HER2	ADCC	42,8%	15,7% (+3,6%)	16,1% (+23,4%)
TNF-alfa	ADCC	19,9%	47,4% (+14,3%)	31,7% (+10,8%)
	CDC	9,9%	25,8% (+14,0%)	19,0% (+23,1%)
nanoluciferasa				
Modelo	Ensayo	CV sobre EC50	CV sobre Potencia del 80% (e inclinación relativa)	CV sobre Potencia del 125% (e inclinación relativa)
CD20	ADCC	22,8%	9,1% (+5,5%)	19,0% (-4,4%)
	CDC	13,5%	19,8% (-18,8%)	7,7% (-15,4%)
HER2	ADCC	4,4%	11,4% (-13,4%)	14,2% (+9,5%)
TNF-alfa	ADCC	14,5%	20,6% (-5,6%)	19,9% (-8,6%)
	CDC	14,9%	12,1% (+4,3%)	35,8% (+5,4%)

10 Todos los resultados se expresan en porcentajes. Se han realizado tres experimentos independientes en cada uno de los modelos y ensayos. Los coeficientes de variación (CV) de los EC₅₀ y potencias se calculan como la desviación estándar dividida por la media de los datos correspondientes. El sesgo relativo expresa la diferencia entre el valor esperado y el realmente obtenido, en porcentaje del valor esperado, según la fórmula siguiente (en la que P representa la potencia):

$$15 \text{ Inclinación relativa} = \frac{P_{\text{medio}} - P_{\text{teórico}}}{P_{\text{teórico}}} \times 100$$

El objetivo de los ejemplos 11 y 12 siguientes es evaluar la capacidad del presente método para medir unos fenómenos de muerte celular de cinéticas más largas que las utilizadas en los mecanismos de ADCC o de CDC, por ejemplo en el caso de la detección del efecto citotóxico de moléculas contaminantes, tóxicas o pro-apoptóticas.

Ejemplo 11: agente físico

25 Se cultivan unas células Raji transformadas para expresar establemente la nanoluciferasa (50000 células por pocillo) durante 48 horas a 37°C (bajo atmósfera humidificada que contiene un 5% de CO₂) en medio RPMI-1640 que contiene un 10% de SVF, y en presencia o no de un 0,2% de Tritón X-100 (para determinar la liberación máxima), después de exponerse a una radiación ultra-violeta (UV) durante un tiempo variable (0, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 segundos). Después de 48h, se recuperan 25 µl de sobrenadante en cada pocillo, se transfieren en una placa de "medio pocillo" blanca, se mezclan con 25 µl de sustrato NanoGlo[®] diluido al 1/50 en D-PBS, se incuban 3 minutos y se leen sobre un luminómetro Mithras LB940 (Berthold Technologies). Los resultados de la lectura se expresan en RLU ("unidad relativa de luminiscencia"). El porcentaje de células muertas para cada concentración de estaurosporina se determina según la fórmula (RLU[medio sin Tritón])/(RLU[0,2% Tritón]) x100.

35 Después de la extracción del sobrenadante, se vuelve a poner en suspensión el resto de las células, se mezcla extemporáneamente con 0,25 µM final del marcador vital TO-PRO-3 (Life Technologies) y adquirido sobre un citómetro de flujo C6 (BD/Accuri). El porcentaje de células muertas se determina durante el análisis de los datos de citometría como el porcentaje de células que han integrado el TO-PRO-3.

40 Se realizaron dos experimentos idénticos independientes, cuyos resultados se presentan en los gráficos A y B de la figura 27. El gráfico de arriba (A) representa los porcentajes de células muertas determinados según los 2 métodos (luminiscencia de la nanoluciferasa ["lumi.", línea de puntos] o citometría de flujo ["CMF", línea continua]) en función del tiempo de exposición a los UV para un ensayo representativo. El gráfico de abajo (B) representa el porcentaje de células muertas determinado por el método luminiscente ("% mortalidad lumi.") en función del porcentaje correspondiente de células muertas medido por citometría de flujo ("% mortalidad CMF") para el conjunto de las condiciones en el ensayo 1 (línea continua, círculos llenos) y en el ensayo 2 (línea de puntos, cuadrados vacíos). Se ha calculado una regresión lineal entre estos dos parámetros gracias al programa GraphPad Prism y se ha trazado en el gráfico (la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal R² se representan en el gráfico para cada uno de los 2 ensayos).

Ejemplo 12: agente químico

5 Se cultivaron unas células Raji transformadas para expresar establemente la nanoluciferasa (50000 células por pocillo) durante 48 horas a 37°C (bajo atmósfera humidificada que contiene un 5% de CO₂) en presencia de concentraciones crecientes de estaurosporina, una droga pro-apoptótica, en medio RPMI-1640 que contiene un 10% de SVF, y en presencia o no de un 0,2% de Tritón X-100 (para determinar la liberación máxima). Al final de la incubación, se recuperan 25 µl de sobrenadante en cada pocillo, se transfieren en una placa de "medio pocillo" blanca, se mezclan con 25 µL de sustrato NanoGlo[®] diluido al 1/50 en D-PBS, se incuban 3 minutos y se leen sobre un luminómetro Mithras LB940. Los resultados de la lectura se expresan en RLU ("unidad relativa de luminiscencia"). El porcentaje de células muertas para cada concentración de estaurosporina se determina según la fórmula (RLU[medio sin Tritón])/(RLU[0,2% Tritón]) ×100.

15 Después de la extracción del sobrenadante, se vuelve a poner en suspensión el resto de las células, se mezcla extemporáneamente con 0,25 µM final del marcador vital TO-PRO-3 (Life Technologies) y adquirido sobre un citómetro de flujo C6 (BD/Accuri). El porcentaje de células muertas se determina durante el análisis de los datos de citometría como el porcentaje de células que han integrado el TO-PRO-3.

20 Se realizaron dos experimentos idénticos independientes, cuyos resultados se presentan en los gráficos A y B de la figura 28. El gráfico de arriba (A) representa los porcentajes de células muertas determinados según los 2 métodos (luminiscencia de la nanoluciferasa ["lumi.", línea de puntos] o citometría de flujo ["CMF", línea continua]) en función de la concentración en estaurosporina en presencia de la cual las células se han incubado, para un ensayo representativo. El gráfico de abajo (B) representa el porcentaje de células muertas determinado por el método luminescente ("% mortalidad lumi.") en función del porcentaje correspondiente de células muertas medido por citometría de flujo ("% mortalidad CMF") para el conjunto de las condiciones en el ensayo 1 (línea continua, círculos llenos) y en el ensayo 2 (línea de puntos, cuadrados vacíos). Se ha calculado una regresión lineal entre estos dos parámetros gracias al programa GraphPad Prism y se ha trazado en el gráfico (la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal R² se representan en el gráfico para cada uno de los 2 ensayos).

30 Estos resultados muestran por un lado que existe claramente una relación proporcional entre la concentración de estaurosporina y la mortalidad de las células diana, sea cual sea el método de medición de la mortalidad. Por otro lado, la mortalidad detectada por la medición de la nanoluciferasa está perfectamente correlacionada con el análisis a nivel celular por citometría de flujo. En efecto, la pendiente de la recta de regresión es cercana a 1 (pendiente = 0,86), así como el coeficiente de regresión lineal (R² = 0,9659).

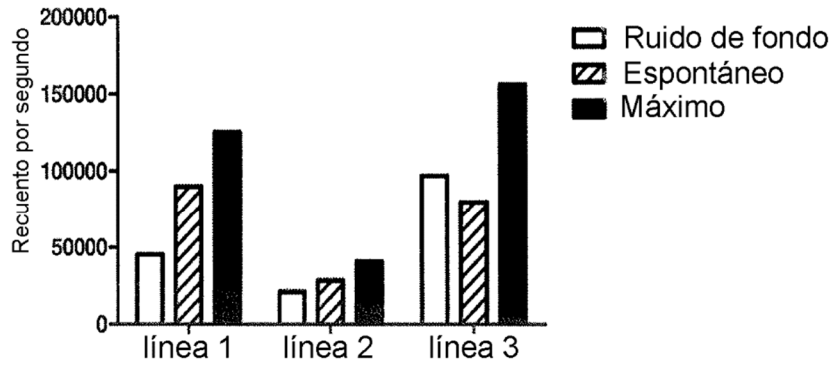
35 Se obtuvieron unos resultados similares (no representados) con las líneas diana SKOV3 y CHO-TNF-alfa que expresan la nanoluciferasa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento no radioactivo de determinación (control y cuantificación) *in vitro* directo de la acción citolítica de un agente activo frente a células diana y/o de un medio que lo rodea de las células diana que comprende las etapas sucesivas siguientes:
- 10 i) Transformación genética de células diana para expresar una enzima exógena a dichas células diana,
- 10 ii) Exposición de dichas células diana genéticamente transformadas con el agente activo y/o con dicho medio que lo rodea a ensayar, pudiendo llevar a la lisis de al menos una parte de las células diana liberando dicha enzima exógena en el medio extracelular,
- 15 iii) Medir la actividad de la enzima exógena liberada durante la lisis de dichas células diana
- 20 caracterizado por que dicha enzima exógena es una enzima de masa molar inferior o igual a 45 kDa que posee una secuencia peptídica que presenta al menos un 60% de homología con la secuencia peptídica salvaje de la subunidad 19 kDa de la luciferasa producida por la gamba *Oplophorus gracilirostris*, y cuya actividad es detectable por luminiscencia o fluorescencia y por que dicha enzima exógena se expresa sola y en forma libre en el citoplasma de dichas células diana.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la masa molar de la enzima exógena es inferior o igual a 30 kDa, preferentemente inferior o igual a 25 kDa, más preferiblemente inferior o igual a 20 kDa.
- 30 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicha enzima exógena es una luciferasa.
- 30 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha enzima exógena posee una secuencia peptídica que presenta al menos un 80% de homología con la secuencia peptídica salvaje de la subunidad 19 kDa de la luciferasa producida por la gamba *Oplophorus gracilirostris*.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha enzima exógena está en una forma de actividad y estabilidad optimizada, comercializada por la compañía Promega bajo el nombre de NanoLuc®.
- 35 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la cantidad de enzima exógena liberada se mide por escisión de un sustrato específico de dicha enzima, siendo el sustrato preferentemente de la familia de la coelenterazina, más particularmente de la familia de la furimazina y de sus derivados.
- 40 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el medio a ensayar que rodea las células comprende un agente biológico y/o un agente químico y/o un agente físico potencialmente activo(s) frente a dichas células diana.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el agente biológico es un anticuerpo, preferentemente seleccionado entre los anticuerpos con objetivo terapéutico, especialmente los anticuerpos monoclonales con objetivo terapéutico.
- 50 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que los anticuerpos son unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por los linfocitos B normales o patológicos, tales como CD19, CD20 o IL-6R (CD126), preferentemente CD20.
- 55 10. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que los anticuerpos son unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por los linfocitos T normales o patológicos, tales como CD3, CD25 o LPAM ("Lymphocyte Peyer Patch Adhésion Molecule" o integrina alfa[4]beta[7]).
- 60 11. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que los anticuerpos son unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células de origen linfoide normales o patológicas, tales como CTLA-4 (CD152), PD-1 (CD279) o CD30 humanas.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que los anticuerpos son unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células de origen linfoide y mieloides normales o patológicas, tales como CD52, VLA4 (CD49d) o LFA-1 (CD11a) humanas.
- 65 13. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que los anticuerpos son unos anticuerpos dirigidos contra unas moléculas expresadas principalmente por unas células carcinoides, tales como -EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento epidérmico - "Epidermal Growth Factor Receptor", también denominado HER1 o ErbB1), EGFR2 (o HER2, o ErbB2), EGFR-3 (o HER3, o ErbB3) o EpCAM (CD326).

14. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que el anticuerpo está dirigido contra la molécula TNF-alfa.
- 5 15. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que el anticuerpo está dirigido contra la molécula VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular - "Vascular Endothelial Growth Factor") o su receptor VEGFR.
- 10 16. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el agente químico y/o físico se selecciona entre los agentes de quimioterapia o las moléculas anti-cancerosas, preferentemente unas moléculas citotóxicas o unas moléculas de la familia de los inhibidores de las proteínas quinasas.
- 15 17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células diana se transforman genéticamente a fin de expresar transitoria o constitutivamente dicha enzima exógena en una forma citoplásmica y no secretada.
- 20 18. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado por que la etapa de transformación genética de dichas células diana comprende la introducción en dichas células de un vector de expresión que lleva la secuencia que codifica la enzima exógena y un promotor de tipo constitutivo que permite su transcripción en una célula, tal como una célula eucariota.
- 25 19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado por que el vector es un vector viral, o un vector plasmídico, preferentemente un vector plasmídico.
- 30 20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 18 o 19, caracterizado por que el vector de expresión de la enzima exógena comprende un gen de resistencia a los antibióticos.
- 35 21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado por que el gen de resistencia a los antibióticos es un gen de resistencia a la geneticina (G418), la puromicina, la blasticidina, la higromicina B, el ácido microfenólico o la zeocina, preferentemente un gen de resistencia a la puromicina.
- 40 22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado por que la introducción de dicho vector de expresión en dichas células se realiza por infección por unas partículas virales que llevan el gen de la enzima exógena cuando el vector de expresión es un vector viral, o por unos métodos químicos o físicos cuando el vector de expresión es un vector plasmídico.
- 45 23. Procedimiento según la reivindicación 22, caracterizado por que, cuando el vector es un vector plasmídico, la introducción en las células diana se realiza por electroporación.
- 50 24. Utilización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), medir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o medir la apoptosis.
25. Kit para la realización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o su utilización según la reivindicación 24, caracterizado por que comprende:
- una línea de células diana que expresan la enzima exógena,
 - unas células efectoras citotóxicas para la realización de un ensayo de ADCC y/o una fuente de complemento para la realización de un ensayo de CDC,
 - un sustrato que activa dicha enzima exógena para producir una emisión de luz, y las eventuales soluciones tampones asociadas,
 - un prospecto explicativo.

A



B

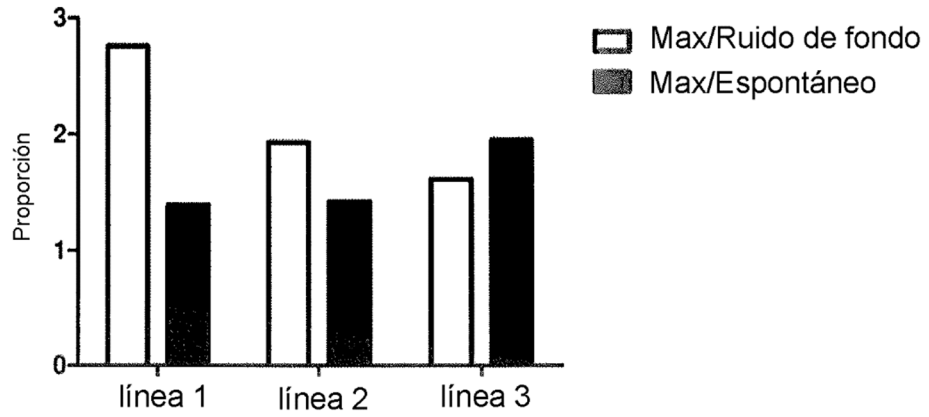


FIG. 1 (Técnica anterior)

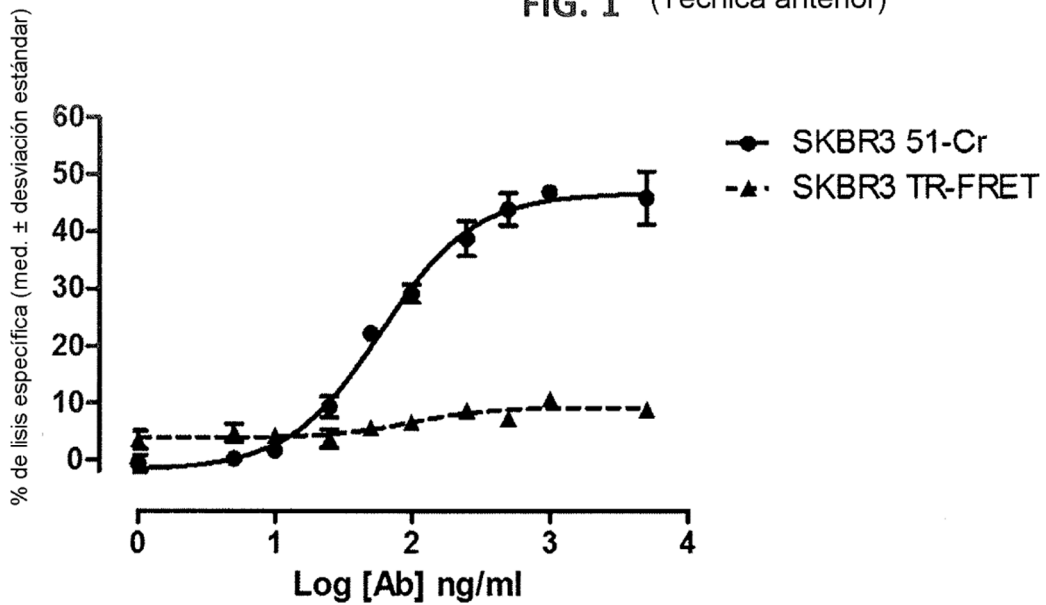


FIG. 2

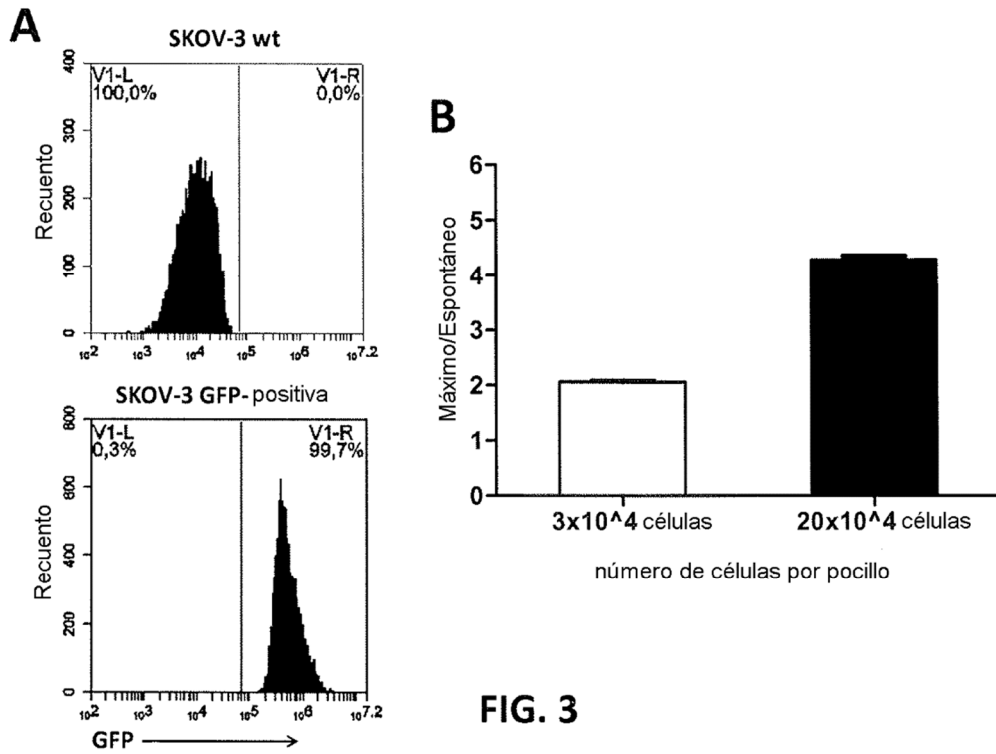


FIG. 3

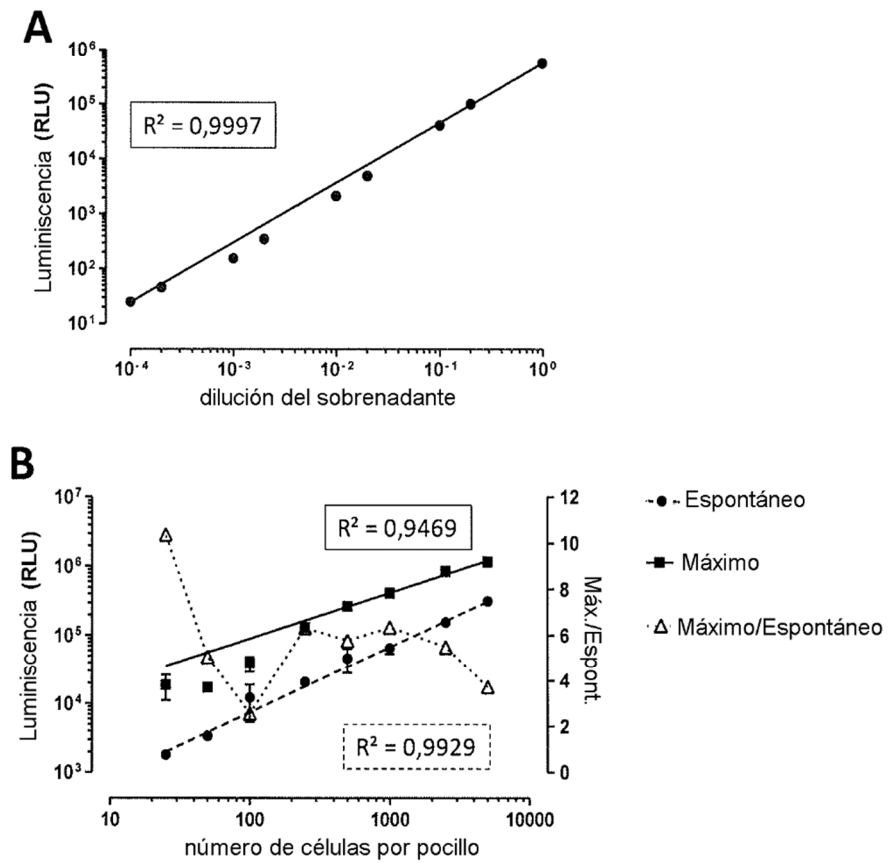


FIG. 4

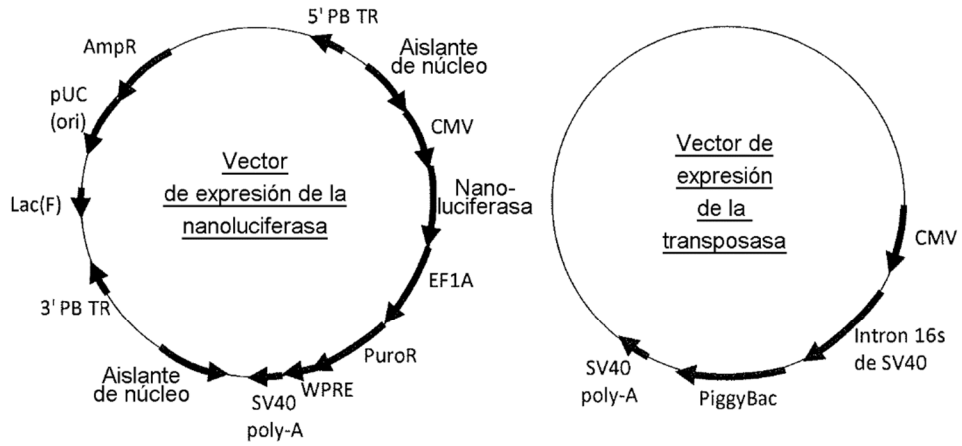


FIG. 5

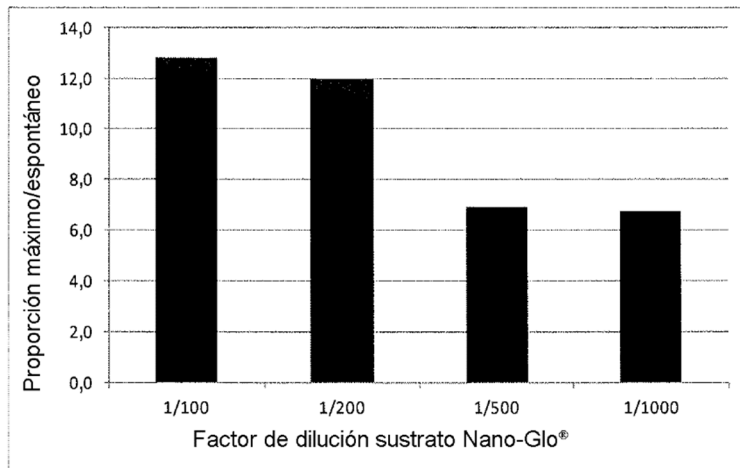


FIG. 6

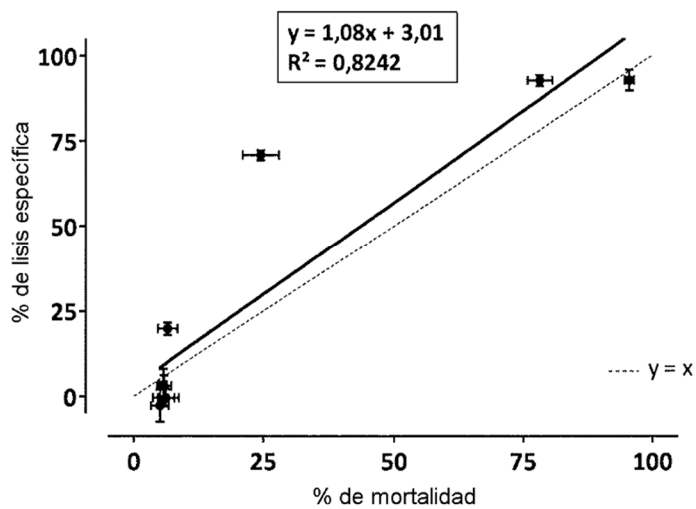


FIG. 7

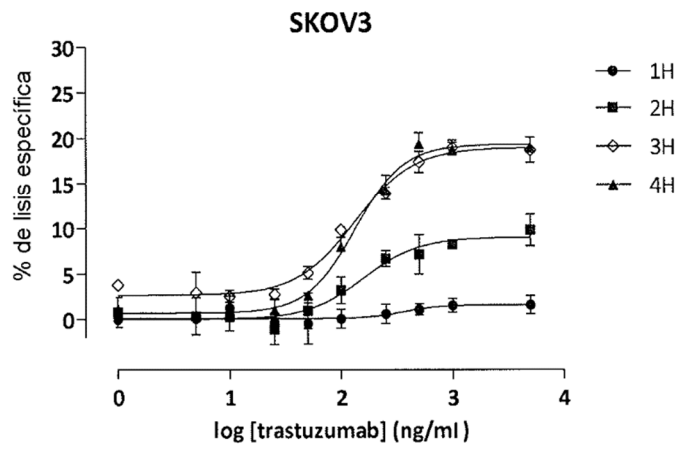
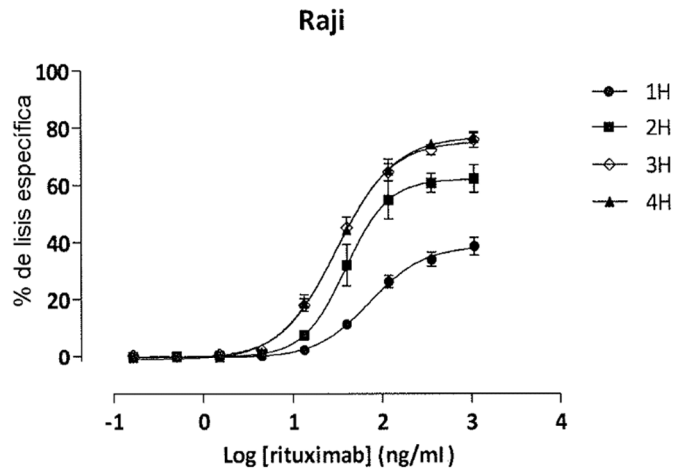


FIG. 8

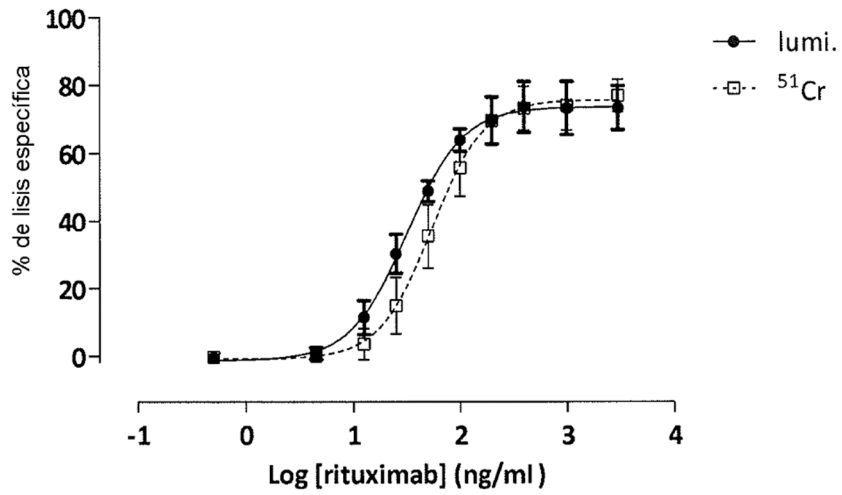


FIG. 9

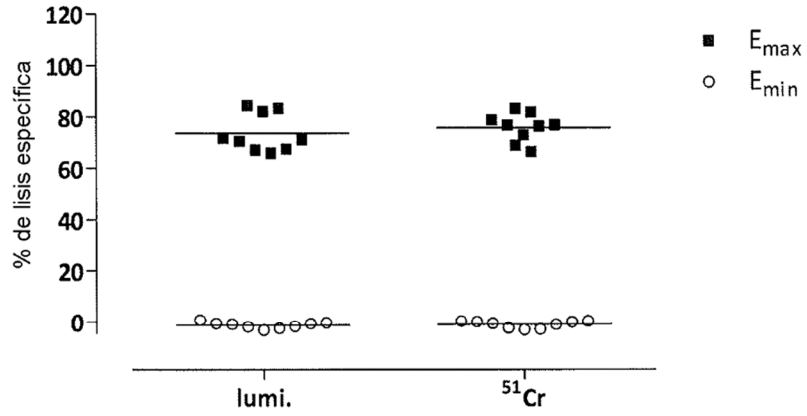


FIG. 10

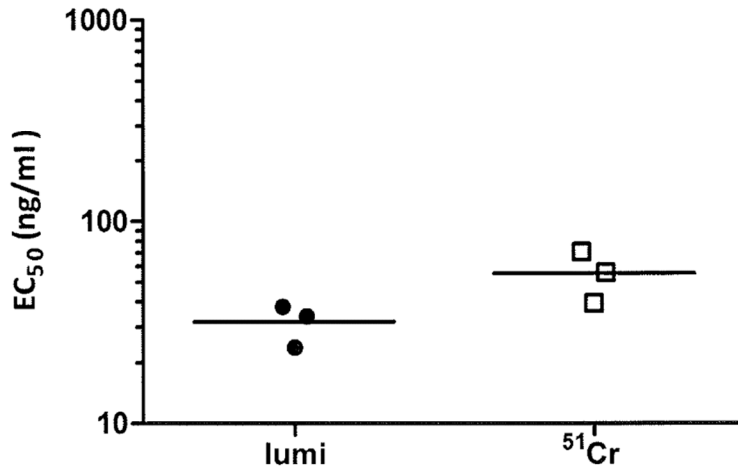


FIG. 11

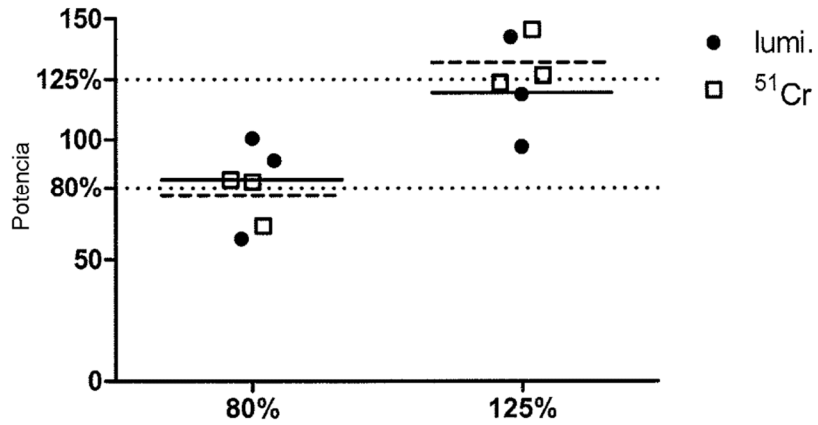


FIG. 12

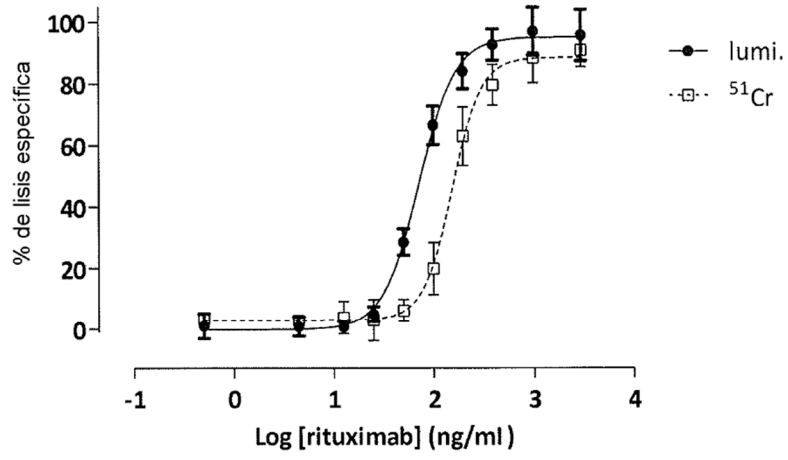


FIG. 13

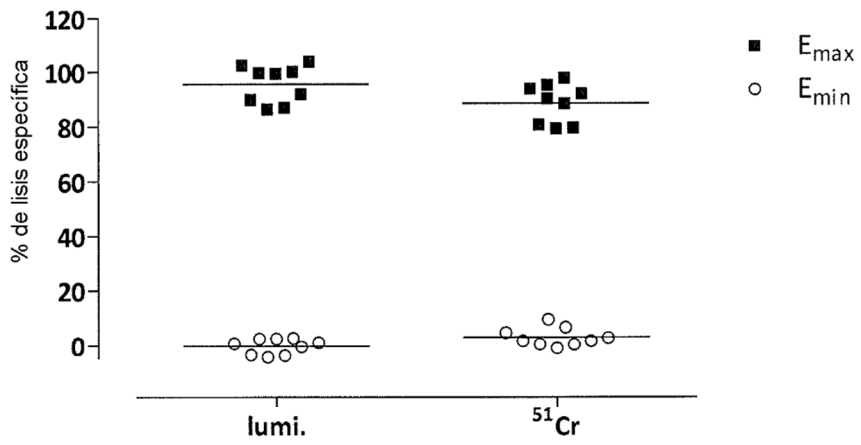


FIG. 14

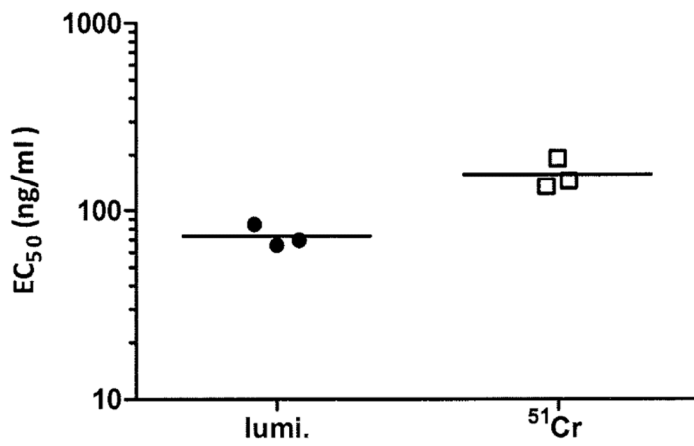


FIG. 15

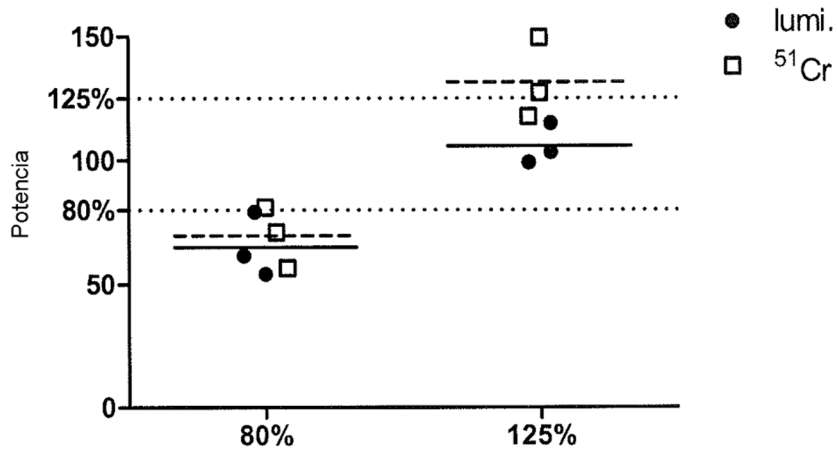


FIG. 16

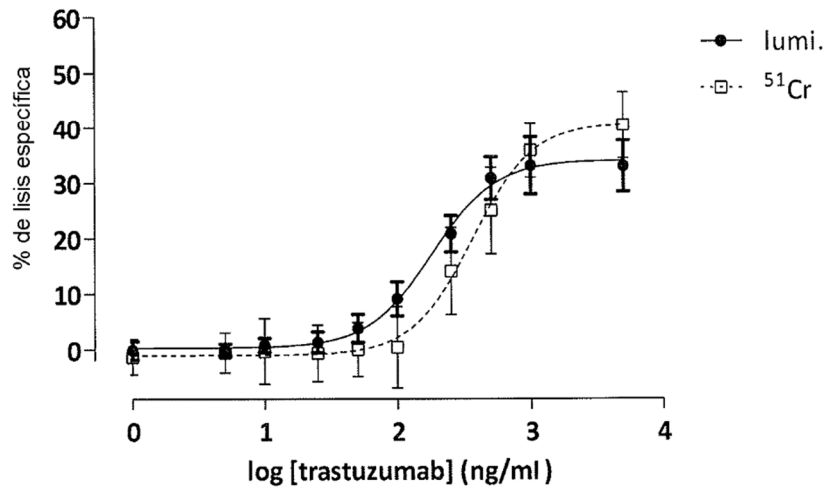


FIG. 17

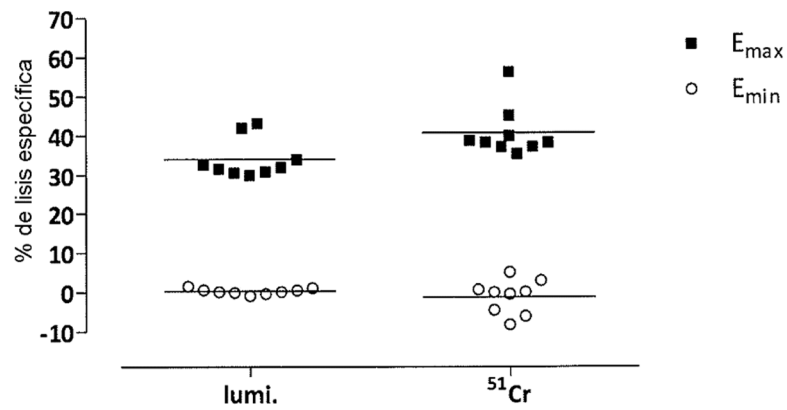


FIG. 18

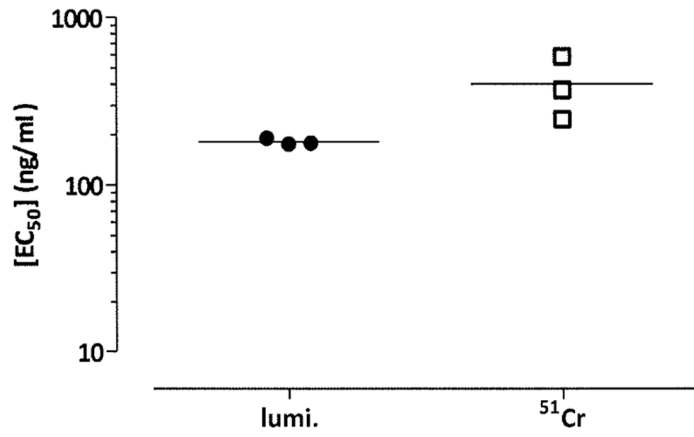


FIG. 19

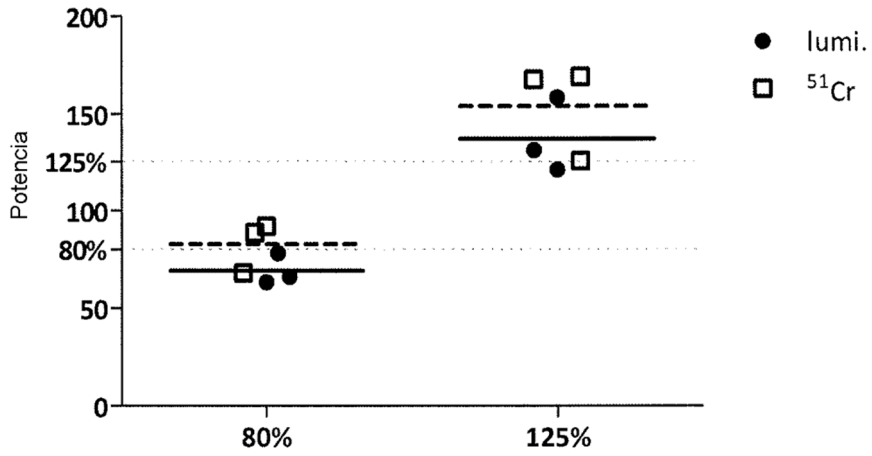


FIG. 20

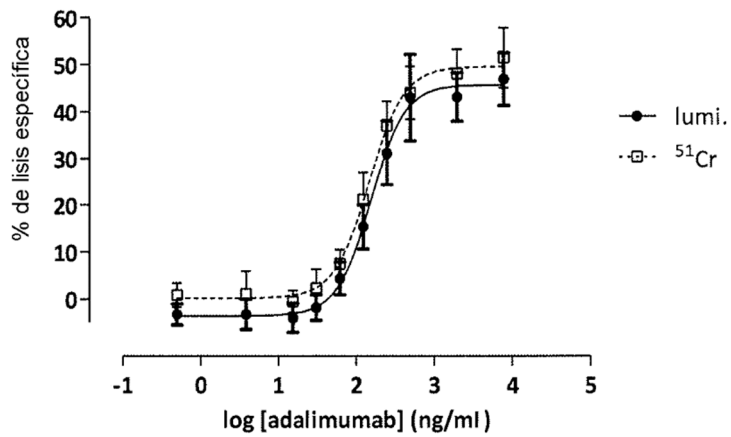


FIG. 21

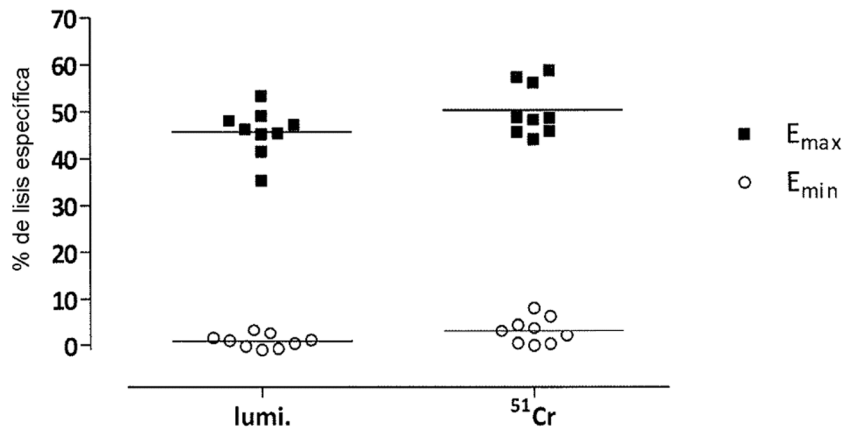


FIG. 22

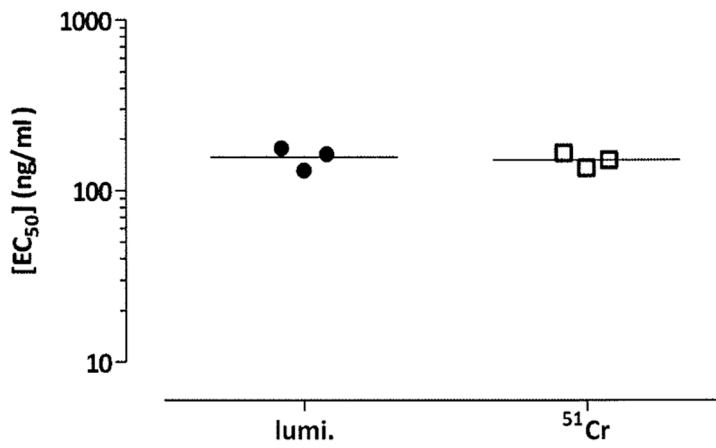


FIG. 23

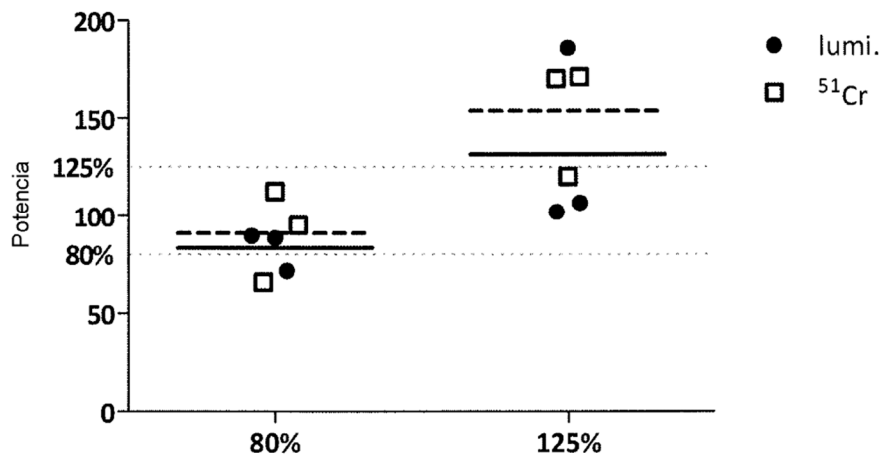


FIG. 24

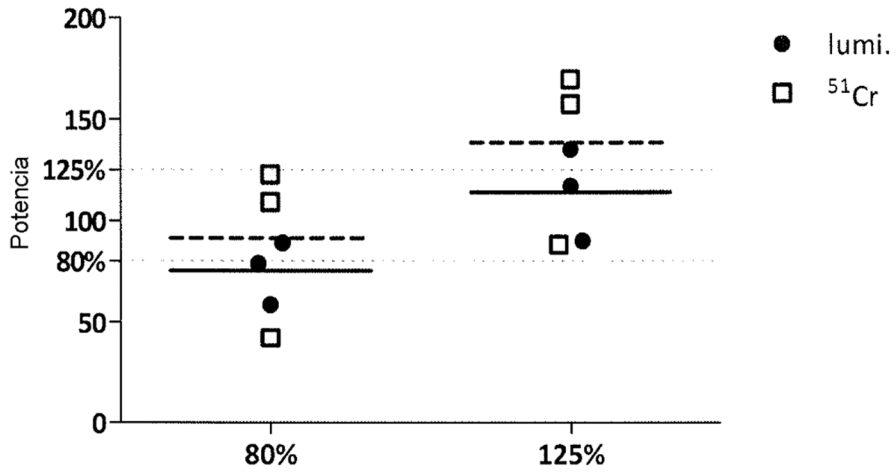


FIG. 25

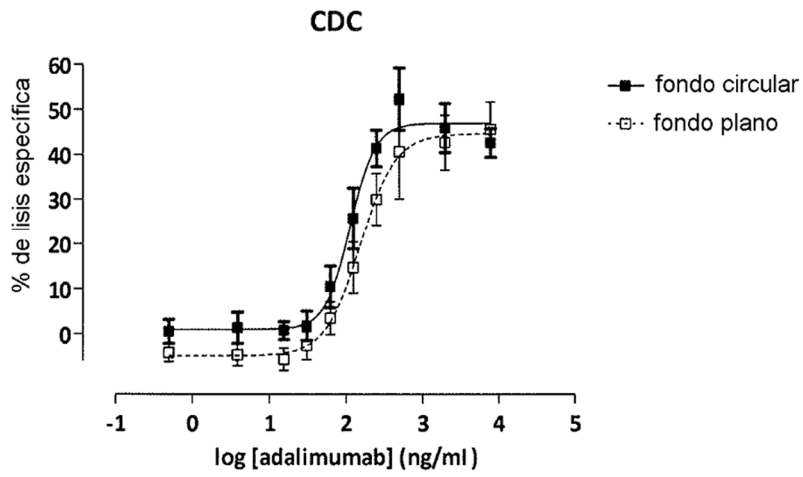
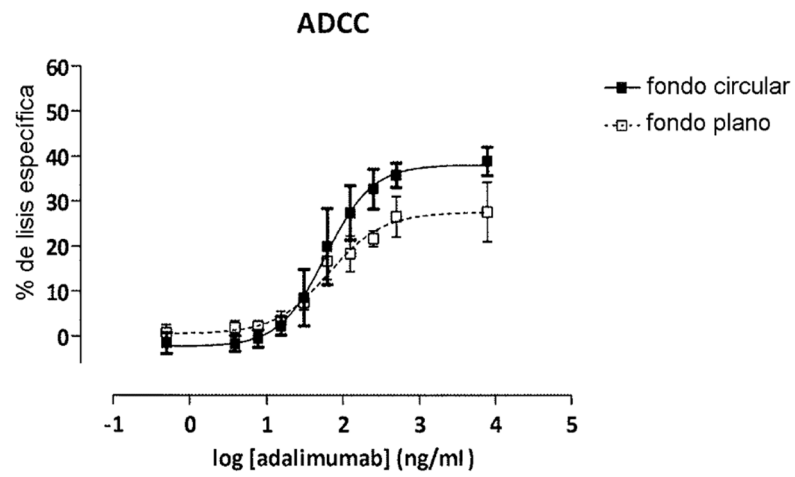


FIG. 26

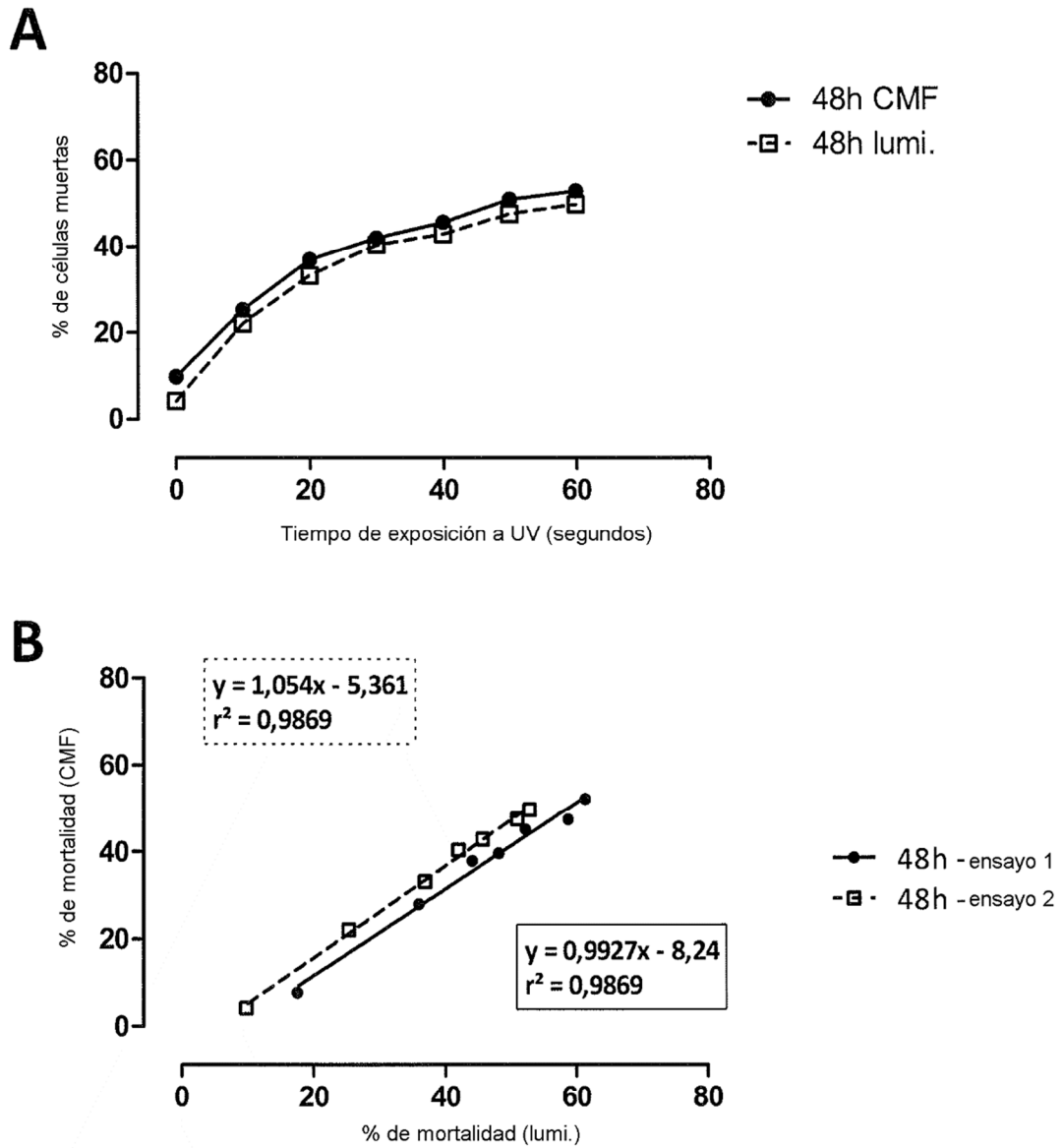


FIG. 27

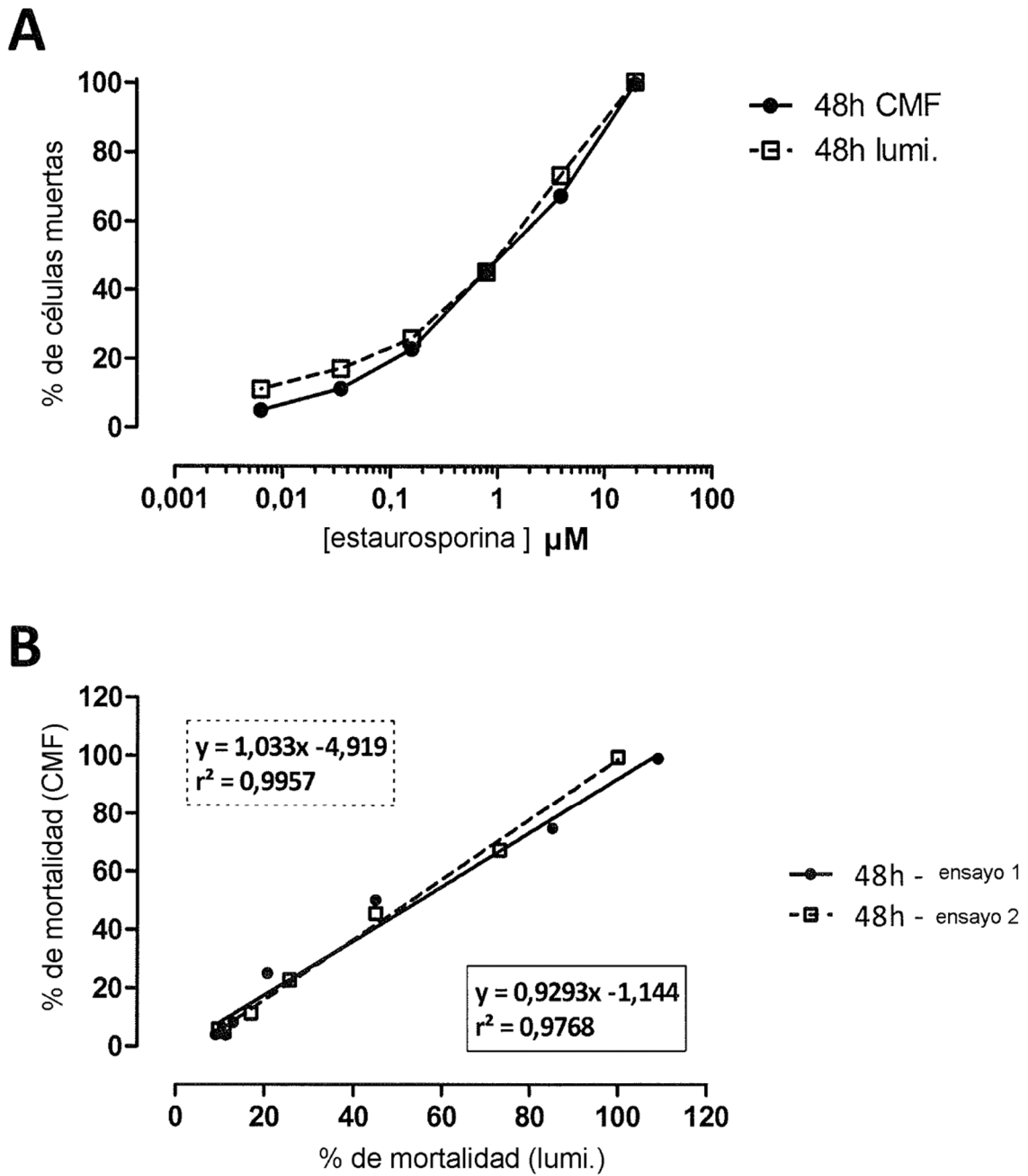


FIG. 28