

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 588**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2019** **PCT/EP2019/056403**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2019** **WO19179871**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2019** **E 19709518 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2023** **EP 3749785**

54 Título: **Sistema y productos para una cuantificación mejorada de la actividad ADCC y ADCP**

30 Prioridad:

19.03.2018 EP 18162485

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2023

73 Titular/es:

SVAR LIFE SCIENCE AB (100.0%)
PO Box 50117
202 11 Malmö, SE

72 Inventor/es:

TOVEY, MICHAEL y
LALLEMAND, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 955 588 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

Sistema y productos para una cuantificación mejorada de la actividad ADCC y ADCP

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células novedosas y a su uso en métodos para determinar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) en una muestra. Las células de acuerdo con la invención pueden usarse en un kit o un kit de partes que puede usarse en un contexto de diagnóstico. De manera importante, las células de acuerdo con la invención pueden usarse para determinar la eficacia de un tratamiento basado en, por ejemplo, anticuerpos o proteínas de fusión de Fc.

Antecedentes de la invención

Es bien sabido que la actividad de varios anticuerpos monoclonales está mediada en parte por la función de células efectoras mediada por el hospedador, incluidas ADCC y/o ADCP. Los anticuerpos se dirigen a un antígeno específico en una célula diana, tal como una célula tumoral o un linfocito que provoca inflamación. Una vez unido a la célula diana, el resto de receptor de Fc de una célula efectora se unirá a la porción Fc del anticuerpo monoclonal y, por lo tanto, efectuará la destrucción de la célula diana por la célula efectora.

Para cuantificar la eficacia de un anticuerpo en dicho proceso de ADCC o ADCP, es necesario disponer de células efectoras, células diana y células diana de control que se usan para determinar la eficacia del anticuerpo. En la técnica anterior, se cosechan células efectoras endógenas, células citolíticas naturales (NK), de sujetos humanos y células diana de sujetos humanos o líneas celulares tumorales establecidas y se usan esas células diana en tales pruebas. En el ensayo clásico, las células diana se cargan con cromo de modo que la destrucción celular puede determinarse mediante la liberación del cromo. Este método adolece de muchas desventajas, tales como que deben cosecharse las células efectoras usadas de sujetos humanos y, por lo tanto, hay una gran variabilidad en las células que se usan para la cuantificación. Además, es difícil y costoso obtener las células de esta manera. Por ejemplo, hay una variación sustancial de donante a donante. Además, para un control negativo en este ensayo clásico, se usaría una línea celular que no expresa el receptor diana, tal como CD20 para rituximab y erbB2 para trastuzumab. Por lo tanto, por ejemplo, se usaría una línea de células T que no expresa CD20. La desventaja del uso de dicha célula diana de control negativo es, por supuesto, que la célula difiere en muchos aspectos además de la ausencia de expresión de CD20 con respecto a la célula diana y no constituye un buen control.

Otra desventaja es que son ensayos largos y prolongados y a menudo tienen que incubarse durante la noche. El rango dinámico está restringido y la sensibilidad es pobre. El rango dinámico es la diferencia entre la señal máxima alcanzable a la concentración más alta del fármaco y por el control y cero (sin muestra de fármaco). La sensibilidad es la actividad generada por pequeñas cantidades de anticuerpo, es decir, cuanto menor sea la cantidad de anticuerpo necesaria para generar actividad detectable, mayor será la sensibilidad del ensayo. Otra desventaja es que los ensayos a menudo son imprecisos, lo que dificulta la detección de pequeñas diferencias entre diferentes variantes de un anticuerpo monoclonal.

Se ha descrito una mejora en este ensayo de cuantificación convencional por Parekh *et al* (1) y lo modificaron y comercializaron (2). En el ensayo, se desarrolla una línea celular efectora recombinante que contiene un constructo de gen indicador sensible a NFAT que responde a la unión del resto Fc de inmunoglobulinas al receptor FcγIIIa (CD16) mediante la activación del gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) y la emisión de luz que puede cuantificarse en un luminómetro. Estas células efectoras se comercializan en un formato de congelación, descongelación y uso (3). Es una mejora respecto al ensayo lítico convencional ya que usa un marcador sustituto del mecanismo de ADCC que puede cuantificarse de una manera mucho más sensible con un rango dinámico algo mayor en un formato mucho más conveniente, ya que no es necesario cosechar las células efectoras, sino que se usan las células de congelación y descongelación. De manera similar, la actividad de ADCP también puede cuantificarse de manera similar usando células efectoras que expresan FcγIIa (CD32) funcionalmente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga sensible a NFAT y células diana de tipo silvestre (WT). Tal línea celular efectora de ADCP está disponible comercialmente (Promega Corporation Madison WI). El uso de estas células junto con las células diana WT para evaluar la actividad ADCP de un anticuerpo da como resultado un ensayo con un rango dinámico restringido y sensibilidad limitada.

Además, recientemente (3) se ha descrito una línea celular efectora recombinante novedosa y se ha divulgado en el documento WO 2018/065401 en la que el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) está regulado por un promotor químico sintético novedoso que contiene sitios de unión para los principales factores de transcripción (NF-AT, AP1, NFκB y STAT5) activados después de la interacción del resto Fc de un anticuerpo con el receptor FcγRIIIa en las células efectoras. Además, en el presente documento se divulga una línea celular efectora recombinante novedosa que expresa CD32 unido funcionalmente al gen indicador de luciferasa de luciérnaga regulado por el mismo promotor químico sintético que se divulga en el documento WO 2018/065401. Las células efectoras recombinantes que expresan CD16 o CD32 funcionalmente unidos al gen indicador de FL regulado por el promotor químico divulgado en el documento WO 2018/065401 confieren sensibilidad mejorada y un rango dinámico mejorado, en relación con las

líneas celulares efectoras modificadas por ingeniería genética que expresan un gen indicador regulado por NFAT, cuando se usan en un ensayo de ADCC o ADCP respectivamente junto con células diana modificadas por ingeniería genética que sobreexpresan un alto nivel constante del antígeno específico reconocido por el anticuerpo.

5 El documento WO 2017/186121 se refiere a un método para mejorar la función de una célula de respuesta inmunitaria y una célula de respuesta inmunitaria que expresa al menos un receptor capaz de unirse a un antígeno e interferón de tipo I. La célula tiene una capacidad significativa para destruir tumores o patógenos y puede usarse para tratar tumores y enfermedades infecciosas.

10 Lallemand, C., *et al.*, J. Immunol. Res., vol 2017, págs. 1-19, se refieren a células efectoras de ADCC novedosas que expresan la variante V o la variante F de FcγRIIIa (CD16a) y luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor quimérico que incorpora secuencias de reconocimiento para los principales factores de transcripción implicados en la transducción de señales de FcγRIIIa, junto con células diana novedosas que sobreexpresan un alto nivel constante del antígeno específico reconocido por rituximab, trastuzumab, cetuximab, infliximab, adalimumab o etanercept, confiriendo sensibilidad, especificidad y rango dinámico mejorados en un ensayo de ADCC en relación con células efectoras que expresan un gen indicador regulado por NFAT y células diana de tipo silvestre.

15 El documento WO 2016/040441 se refiere a receptores quiméricos que comprenden un dominio extracelular con afinidad y específico para la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina (Ig), un dominio de unión a Fc; un dominio transmembrana; al menos un dominio de señalización coestimulador; y un dominio de señalización citoplasmático que comprende un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM). Además, el documento se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales receptores quiméricos y células inmunitarias que expresan los receptores quiméricos. El documento proporciona células inmunitarias que pueden usarse para potenciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y/o para potenciar la inmunoterapia basada en anticuerpos, tal como inmunoterapia contra el cáncer.

20 Sallin, M. A. *et al.*, Cancer Immun., Immunotherapy, 2014, 63(9), págs. 947-958, se refiere a anticuerpos monoclonales (mAb) agonistas dirigidos contra la molécula de señalización conjunta CD137 (4-1 BB) que provocan una potente inmunidad antitumoral en ratones. Las respuestas antitumorales mejoradas se asociaron con un aumento de las poblaciones de células dendríticas (DC) y células T CD8β esplénicas. Los resultados demuestran un papel inhibidor inesperado para FcγRIII en la función antitumoral de anti-CD137 y subrayan la necesidad de considerar el isotipo de anticuerpo cuando se diseñan por ingeniería genética mAb terapéuticos.

25 El documento WO 2015/179833 se refiere a composiciones y métodos para superar la mala respuesta a la terapia con anticuerpos, por ejemplo, resistencia a anticuerpos. El documento también se refiere a al menos un receptor inmunitario (IR) específico para el receptor de Fc, a vectores que comprenden el mismo y a células T recombinantes que comprenden el receptor inmunitario Fc, y a métodos para administrar una célula T modificada que expresa un receptor inmunitario que comprende un dominio de unión a Fc.

30 No obstante, siempre existe el deseo de mejorar adicionalmente los ensayos cuantitativos de ADCC y ADCP. Sería deseable disponer de un ensayo que tenga un rango dinámico mucho mejor, y una sensibilidad mejorada particularmente para la cuantificación de la actividad ADCP.

35 La presente invención se refiere a la sobreexpresión en una célula efectora y/o diana de una o más moléculas coestimuladoras que da como resultado un rango dinámico notablemente potenciado y una sensibilidad aumentada cuando dichas células se usan para evaluar la actividad ADCC o ADCP de un anticuerpo.

Figuras

40 La figura 1A ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras iLite® (variante V) cotransfectadas o no con células diana CD137 y HEK293 que sobreexpresan ERBB2 solo o que sobreexpresan ERBB2 y CD86, o que sobreexpresan ERBB2, CD86 y CD137L.

45 La figura 1B ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras iLite® (variante V) cotransfectadas o no con la molécula de señalización transmembrana zeta asociada con células diana CD3 y Raji que sobreexpresan CD20.

50 La figura 2A ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras iLite® (variante V) y células diana Raji que sobreexpresan CD20 solo o que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

55 La figura 2B ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras iLite® (variante F) y células diana Raji que sobreexpresan CD20 solo o que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86.

60 La figura 3A ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras

iLite[®] (variante V) y células diana Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana Raji de tipo silvestre.

La figura 3B ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana Raji de tipo silvestre.

La figura 4A ilustra la actividad ADCC de rituximab usando células efectoras *iLite*[®], variante V, que sobreexpresan CD28 y células diana Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

La figura 4B ilustra la actividad ADCC de rituximab usando células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan CD28 y células diana Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86.

La figura 5A ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana Raji de tipo silvestre.

La figura 5B ilustra una comparación de la actividad ADCC de rituximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y Raji que sobreexpresan tanto CD20 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana Raji de tipo silvestre.

La figura 6A ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) y células diana HEK293 o bien que sobreexpresan erbB2 solo o bien que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

La figura 6B ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 solo o que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86.

La figura 7A ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) y células diana HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre.

La figura 7B ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre.

La figura 8A ilustra la actividad ADCC de trastuzumab usando células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

La figura 8B ilustra la actividad ADCC de trastuzumab usando células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como la molécula coestimuladora CD86.

La figura 9A ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre.

La figura 9B ilustra una comparación de la actividad ADCC de trastuzumab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como la molécula coestimuladora CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre.

La figura 10A ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) y células diana HEK293 que sobreexpresan o bien EGFR solo o bien tanto EGFR como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

La figura 10B ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana HEK293 que sobreexpresan o bien EGFR solo o bien tanto EGFR como la molécula coestimuladora CD86.

La figura 11A ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) y células diana HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana A431 de tipo silvestre.

5 La figura 11B ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como la molécula coestimuladora CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana A431 de tipo silvestre.

10 La figura 12A ilustra la actividad ADCC de cetuximab usando células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86 o CD80 y CD86.

15 La figura 12B ilustra la actividad ADCC de cetuximab usando células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como la molécula coestimuladora CD86.

20 La figura 13A ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante V) y células diana A431 de tipo silvestre.

25 La figura 13B ilustra una comparación de la actividad ADCC de cetuximab determinada usando las células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que sobreexpresan tanto EGFR como la molécula coestimuladora CD86 frente a células efectoras sensibles a NFAT (variante F) y células diana A431 de tipo silvestre.

La figura 14A ilustra la actividad ADCC de infliximab determinada usando células efectoras *iLite*[®] (variante V) y células diana HEK293 que expresan o bien TNF α unido a membrana solo o bien TNF α unido a membrana y las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86.

30 La figura 14B ilustra la actividad ADCC de infliximab determinada usando células efectoras *iLite*[®] (variante F) y células diana HEK293 que expresan o bien TNF α unido a membrana solo o bien TNF α unido a membrana y las moléculas coestimuladoras CD80 y/o CD86.

35 La figura 15A ilustra la actividad ADCC de infliximab determinada usando células efectoras *iLite*[®] (variante V) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que expresan o bien TNF α unido a membrana solo o bien TNF α unido a membrana y las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86 o CD80 y CD86.

40 La figura 15B ilustra la actividad ADCC de infliximab determinada usando células efectoras *iLite*[®] (variante F) que sobreexpresan células diana CD28 y HEK293 que expresan o bien TNF α unido a membrana solo o bien TNF α unido a membrana y las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86.

45 La tabla 1 ilustra el efecto sobre un ensayo de ADCC, expresado como los parámetros principales de un gráfico de 4PL, de la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD80 junto con CD86 en células diana CD20⁺⁺ usadas junto con células efectoras *iLite*[®] que expresan la variante V de CD16A.

La tabla 2 ilustra el efecto sobre un ensayo de ADCC, expresado como los parámetros principales de un gráfico de 4PL, de la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD80 junto con CD86 en células diana ERBB2⁺⁺ usadas junto con células efectoras *iLite*[®] que expresan la variante V de CD16A.

50 La tabla 3 ilustra el efecto sobre un ensayo de ADCC, expresado como los parámetros principales de un gráfico de 4PL, de la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD80 junto con CD86 en células diana EGFR⁺⁺ usadas junto con células efectoras *iLite*[®] que expresan la variante V de CD16A.

55 La tabla 4 ilustra el efecto sobre un ensayo de ADCC, expresado como los parámetros principales de un gráfico de 4PL, de la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD80 junto con CD86 en células diana mTNF α ⁺⁺ usadas junto con células efectoras *iLite*[®] que expresan la variante V de CD16A.

Sumario de la invención

60 La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente y proporciona, entre otros, una mejora sustancial en la congelación, descongelación y uso de células efectoras y células diana de ensayos de la técnica anterior para proporcionar una sensibilidad mejorada, y/o un rango dinámico mejorado. En un aspecto, el problema se resuelve mediante, entre otros, la ayuda de una secuencia de polinucleótido modificada por ingeniería genética comprendida en un vector y, en última instancia, una célula de acuerdo con la presente invención.

65

En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de polinucleótido, vector y, en última instancia, células modificadas por ingeniería genética que proporcionan una sensibilidad mejorada en un ensayo.

En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de polinucleótido, vector y, en última instancia, células modificadas por ingeniería genética que proporcionan un rango dinámico mejorado en un ensayo.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona una secuencia de polinucleótido, vector y, en última instancia, células modificadas por ingeniería genética que proporcionan una sensibilidad mejorada en un ensayo y simultáneamente un rango dinámico mejorado en un ensayo.

La sensibilidad mejorada se manifiesta por sí misma en una CE_{50} y LLOQ (límite inferior de cuantificación) sustancialmente mejorados. Específicamente, la presente invención proporciona una línea celular y, en última instancia, el uso de la misma en un kit para una sensibilidad aumentada (medida como CE_{50}) o LLOQ que es al menos aproximadamente 10 veces en comparación con las técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, la sensibilidad o LLOQ aumenta al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces en comparación con técnicas conocidas en la técnica. De manera similar, la presente invención proporciona una línea celular y, en última instancia, el uso de la misma en un kit para un rango dinámico aumentado que es al menos aproximadamente 10 veces en comparación con las técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, el rango dinámico es al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces en comparación con técnicas conocidas en la técnica. Pueden encontrar ejemplos de técnicas conocidas en la técnica en Bhavin S. Parekh, B. S., *et al.* mAbs, 2012, 4(3), págs. 310-318, o por ejemplo Cheng, Z. J., *et al.*, J. Immunol. Methods, 2014, 414, págs. 69-81.

La invención se refiere a una célula según la reivindicación 1.

En particular, la invención se refiere a una célula que comprende uno o más vectores de acuerdo con la invención. Los vectores pueden ser episómicos o estar integrados en el genoma de dicha célula. La célula puede ser de cualquier origen y, en particular, una célula de mamífero. Las células de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier línea celular conocida en la técnica tal como, por ejemplo, Jurkat, Molt4, Raji, SKBR3, NK92, K1YG-1, HEK293, DT-40 y MSB-1. La presente invención se refiere a la sobreexpresión en una célula de una o más moléculas coestimuladoras que dará como resultado un rango dinámico mejorado y una sensibilidad aumentada cuando dichas células se usan para evaluar la actividad ADCC o ADCP de un anticuerpo. Las moléculas coestimuladoras pueden actuar como ligandos cuando se expresan endógenamente o se sobreexpresan en una célula diana que porta un antígeno específico reconocido por el anticuerpo.

En una realización de la invención, la célula diana se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar un alto nivel constante de un antígeno específico reconocido por un anticuerpo terapéutico como se divulga en el documento WO 2018/065401. Las moléculas coestimuladoras pueden actuar como receptores coestimuladores cuando se expresan endógenamente o se sobreexpresan en una célula efectora. En una realización de la invención, la célula efectora se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar o bien el receptor Fc de baja afinidad, variantes V o F de $Fc\gamma RIIIa$ (CD16A) o bien variantes H o R de $Fc\gamma RIa$ (CD32) que responden a la ligadura del resto Fc del anticuerpo unido al antígeno específico expresado en las células diana mediante la activación de un gen indicador sensible a NFAT como se describió previamente (1, 2), o mediante la activación de un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 operativamente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) como se describe en el documento WO 2018/065401.

En otro aspecto de la invención, la célula efectora se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar, por ejemplo, o bien el receptor de Fc de alta afinidad, $Fc\gamma RI$ (CD64), o, por ejemplo, el receptor inhibidor de Fc de baja afinidad $Fc\gamma RIIB1$ (CD32), o el receptor inhibidor de Fc de baja afinidad $Fc\gamma RIIB2$ (CD32) o bien el receptor de Fc de baja afinidad $Fc\gamma RIIB$ (CD16b) que responde a la ligadura del resto Fc del anticuerpo unido al antígeno específico expresado en las células diana mediante la activación de un gen indicador sensible a NFAT como se describió previamente (1, 2), o mediante la activación de un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 operativamente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) como se divulga en el documento WO 2018/065401.

Las moléculas coestimuladoras sobreexpresadas en una célula diana interactuarán con el/los receptor(es) coestimulador(es), expresado(s) endógenamente o sobreexpresado(s), en la célula efectora y potenciarán la interacción del resto Fc de un anticuerpo con los receptores $Fc\gamma IIIa$ o $Fc\gamma II$ en la célula efectora dando como resultado una expresión marcadamente potenciada del gen indicador unido al receptor $Fc\gamma IIIa$ o $Fc\gamma II$. Esto tiene como consecuencia un marcado aumento en el rango dinámico y la sensibilidad de un ensayo de ADCC o ADCP usando células efectoras que expresan un gen indicador sensible al receptor $Fc\gamma IIIa$, respectivamente, como se divulga en el documento WO 2018/065401, o células efectoras que expresan un gen indicador sensible a $Fc\gamma II$ como se describe en el presente documento o disponible comercialmente respectivamente con dichas células diana que expresan una

o más moléculas coestimuladoras que incluyen CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y CD137 (4-1 BB) además del antígeno específico reconocido por el anticuerpo.

Se entiende que otras moléculas coestimuladoras tales como ICOS-L (Ligando Coestimulador Inducible), también pueden expresarse en las células diana para potenciar la expresión del gen indicador unido al receptor o bien Fc γ IIa o bien Fc γ II en un ensayo de ADCC o ADCP, respectivamente, después de su interacción con el receptor de ICOS, expresado endógenamente o sobreexpresado en las células efectoras. En una realización adicional de la invención, los receptores de punto de control inmunitario tales como CTLA-4 (CD152) se invalidan específicamente en células efectoras usando edición genómica para evitar la regulación por disminución de CD80 y CD86 en células diana. En una realización adicional de la invención, la molécula de señalización transmembrana de la cadena zeta de CD3 (CD247) se sobreexpresa en las células efectoras ADCC para potenciar la señalización del motivo de activación de tirosina inmunorreceptora (ITAM) asociado a Fc γ RIIIa y la expresión potenciada del gen indicador unido al receptor Fc γ IIa.

En un aspecto, la invención se refiere a una célula que puede denotarse como una célula efectora, en donde uno o más de CD28, CD137 (4-1BB), CD247 (cadena Zeta T3) o CD278 (ICOS) o bien se expresan constitutivamente o bien se sobreexpresan en las células efectoras.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula que puede denotarse como una célula diana, en donde uno o más de CD80, CD86, CD137L y/o CD278L o bien se expresan constitutivamente o bien se sobreexpresan en las células diana.

La invención también se refiere a un kit o un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 10.

El kit también comprende una célula diana en donde se potencia la misma diana, es decir, de manera que la diana se sobreexpresa como se divulga en el documento WO 2018/065401 y en el que se potencia la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

La diana puede ser, en principio, cualquier diana a la que pueda unirse el anticuerpo relevante. En un aspecto, la diana puede ser uno o más de CD20, mTNF α , erbB2, EGFR.

El kit también puede comprender uno o más viales, tales como por ejemplo 2 o más viales, etc. En un aspecto, el kit puede comprender un vial que comprende una mezcla de células i) con una mezcla de células ii). En tal caso, el kit comprende dos viales, el segundo vial comprende las células de iii) como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, en un caso, el kit comprende dos viales en donde un vial comprende las células efectoras i) y las células diana ii) que tienen la diana frente a la que se potencia/sobreexpresa específicamente el anticuerpo en cuestión. En consecuencia, el segundo vial comprende las células diana iii), en donde la diana está invalidada o la diana/receptor está delecionada o, de otro modo, puede no ser funcional o, por cualquier medio, ha perdido su capacidad para unirse al anticuerpo en cuestión.

En un aspecto de la invención, un vial del kit comprende una mezcla de células i) con una mezcla de células ii) en una razón óptima denominada en el presente documento razón E:T, en donde E denota las células en el párrafo i) anterior (células efectoras). T denota las células en iii) anteriores (células diana). La razón E:T óptima se describe adicionalmente en el presente documento y en la parte experimental.

En el kit y el método de acuerdo con la invención, se usa la misma razón E:T para las células efectoras i) y las células diana iii), como se ha encontrado para la relación entre las células efectoras i) y las células diana ii).

Descripción detallada de la invención

Estas características se obtienen por medio de la presente invención en la que se usan células efectoras recombinantes que expresan CD16A (variante V o F) funcionalmente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga como se divulga en el documento WO 2018/065401, o células efectoras que expresan CD32 (variante H o R) funcionalmente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga como se describe en el presente documento, o células efectoras modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar o bien el receptor de Fc de alta afinidad, Fc γ RI (CD64), o el receptor inhibidor de Fc de baja afinidad Fc γ RIIB1 (CD32), o el receptor inhibidor de Fc de baja afinidad Fc γ RIIB2 (CD32) o bien el receptor de Fc de baja afinidad Fc γ RIIIB (CD16b) funcionalmente unido al gen indicador de luciferasa de luciérnaga como se divulga en el documento WO 2018/065401, o al gen indicador de luciferasa de luciérnaga como se divulga en el presente documento o células efectoras que expresan CD16A o CD32 funcionalmente unido al gen indicador sensible a NFAT como están disponibles comercialmente, que expresan endógenamente o sobreexpresan uno o más receptores coestimuladores que incluyen CD28, CD137 (4-1BB), e ICOS, junto con células diana que expresan un antígeno reconocido específicamente por un anticuerpo y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras que incluyen CD80, CD86, CD132L o ICOSL, dando como resultado un rango dinámico potenciado y una sensibilidad aumentada cuando dichas células se usan para evaluar la actividad ADCC o ADCP de un anticuerpo.

En consecuencia, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia reguladora de actuación en cis operativamente unida a un promotor aguas abajo, en donde uno o más de NF-AT, AP1, NFkB, STAT1, STAT3 y STAT5 son capaces de unirse a dicha secuencia reguladora de actuación en cis. En un aspecto de la invención, NF-AT, AP1, NFkB, y STAT5 son todos capaces de unirse a dicha secuencia reguladora de actuación en cis.

El promotor puede estar operativamente unido a una secuencia de marco de lectura abierto que codifica una primera proteína indicadora, tal como, por ejemplo, una enzima que puede ser una luciferasa o una proteína fluorescente.

El polinucleótido de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en un nucleótido de acuerdo con;

GGAAGCGAAA ATGAAATTGA CTGGGACTTT CCGGAGGAAA AACTGTTTCA
TACAGAAGGC GTGGATGTCC ATATTAGGAT GAGTCAGTGA CGTCAGAGCC
TGATTTCCCC GAAATGATGA GCTAG.

En un aspecto, el polinucleótido de acuerdo con la invención es un polinucleótido artificial, modificado por ingeniería genética.

La invención también se refiere a un constructo de vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención. El constructo de vector puede ser un plásmido o vector viral.

En un aspecto de la invención, el constructo de vector puede comprender la secuencia de polinucleótidos como se expone en la SEQ ID NO.:1, y que comprende además una o más secuencias de nucleótidos capaces de codificar proteínas para la expresión de una o más moléculas coestimuladoras como se divulga en el presente documento.

Además, la invención también se refiere a una célula que comprende el vector de acuerdo con la invención. Específicamente, la presente invención se refiere a una célula modificada por ingeniería genética que comprende el vector de acuerdo con la invención. El vector puede ser episómico o estar integrado en el genoma de dicha célula. En un aspecto de la invención, la célula puede expresar además una segunda proteína indicadora que es diferente de la primera proteína indicadora. En otro aspecto adicional de la invención, la célula puede ser recombinante.

En un aspecto de la invención, la célula que comprende el vector con el polinucleótido (SEQ ID NO.:1) como se establece en el presente documento puede ser la célula efectora.

En un aspecto de la invención, la célula que comprende el vector con el polinucleótido (SEQ ID NO.:1) como se establece en el presente documento puede ser la célula efectora, y en donde el vector comprende además una o más secuencias de nucleótidos capaces de codificar proteínas para la expresión de una o más moléculas coestimuladoras como se divulga en el presente documento. Ejemplos a modo de ejemplo y no limitativos son uno o más de CD28, CD137 (4-1BB), CD247 (cadena Zeta T3) o CD278 (ICOS) que o bien pueden expresarse constitutivamente o bien sobreexpresarse en las células efectoras (por ejemplo, en la superficie celular).

Por lo tanto, en un aspecto de la invención, las células son células efectoras que pueden expresar CD16A funcionalmente unido al gen indicador, tal como, por ejemplo, el gen que expresa una enzima que puede ser una luciferasa o una proteína fluorescente.

Alternativamente, las células de acuerdo con la invención son células efectoras que pueden expresar CD32 funcionalmente unido al gen indicador, tal como, por ejemplo, el gen que expresa una enzima que puede ser una luciferasa o una proteína fluorescente.

En un aspecto de la invención, las células efectoras de acuerdo con la invención expresan además endógenamente o sobreexpresan uno o más receptores coestimuladores. En principio, tales receptores coestimuladores pueden ser cualquier receptor adecuado y pueden ser, por ejemplo, uno o más de CD28, CD137 (4-1BB) e ICOS. Además, uno o más de CD28, CD137 (4-1BB), CD247 (cadena Zeta T3) o CD278 (ICOS) pueden expresarse constitutivamente o sobreexpresarse en las células efectoras.

La invención también se refiere a células diana. Además, las células diana expresan un antígeno específicamente reconocido por un anticuerpo. En un aspecto de la invención, las células diana sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras tales como, por ejemplo, uno o más de CD80, CD86, CD132L, CD137L o ICOSL. Además, uno o más de CD80, CD86, CD137L y/o CD278L pueden expresarse constitutivamente o sobreexpresarse en las células diana.

En una realización adicional de la invención, los receptores de punto de control inmunitario tales como CTLA-4 (CD152)

se invalidan específicamente en las células efectoras usando edición genómica para evitar la regulación por disminución de CD28 y, a su vez, la exclusión del efecto de la sobreexpresión de CD80 y CD86 en las células diana. En una realización adicional de la invención, la molécula de señalización zeta asociada a CD3 transmembrana (CD247) que contiene tres motivos de activación de tirosina inmunorreceptora (ITAM) se sobreexpresa en las células efectoras ADCC para potenciar la señalización de ITAM asociada a Fc γ RIIIa y la expresión potenciada del gen indicador unido al receptor Fc γ RIIIa. En una realización preferida, para proporcionar una normalización del ensayo, las células efectoras recombinantes tienen además un constructo para la producción constitutiva de una luciferasa que es diferente de la usada en el constructo del gen indicador. Por ejemplo, cuando el constructo del gen indicador produce luciferasa de luciérnaga, la producción constitutiva puede ser de una segunda luciferasa, por ejemplo, luciferasa de Renilla (4). La actividad de la primera luciferasa normalizada en relación con la actividad de la segunda luciferasa se describe en el documento US 2011/0189658. Cuando se realiza el ensayo, después de medir el gen indicador luciferasa, se añade entonces un reactivo para extinguir esa luciferasa específica de modo que cualquier lectura posterior solo leerá la luciferasa del constructo constitutivo, que entonces puede usarse con el propósito de normalización, como se describirá con más detalle en los ejemplos.

Las ventajas de usar la expresión constitutiva de cualquier luciferasa es que los resultados no se ven influidos por la pérdida de células efectoras o por la destrucción por parte de células diana de células efectoras, ni los resultados se ven influidos por los efectos de la matriz sérica. Todos estos pueden compensarse mediante la normalización obtenida a través del uso de la medición de la expresión constitutiva de la otra (segunda) luciferasa. Ninguna de estas ventajas puede obtenerse en el procedimiento de ensayos de la técnica anterior que no usan tal normalización.

En una realización preferida de la presente invención, se producen células diana a partir del mismo tipo de célula diana que se mide *in vivo*, pero con el antígeno para el que el anticuerpo es específico que se invalida, por un lado (control negativo) o su expresión se potencia de manera constante, por el otro (control positivo) como se describe en el documento WO 2018/065401. Los ensayos de la técnica anterior usan solo células diana de tipo silvestre que expresan cantidades variables del antígeno para el que es específico el anticuerpo, no recombinante, para el control positivo, y células naturales que no expresan constitutivamente el antígeno para el que el anticuerpo es específico, para el control negativo. Por ejemplo, en el ensayo de CD20, se usan células T que no expresan constitutivamente CD20 como control negativo. Para el control positivo, se usan células B de tipo silvestre como diana.

Mediante el uso de una célula diana recombinante en la que se ha invalidado el antígeno frente al que es específico el anticuerpo, se tiene un control negativo muy mejorado ya que las células T son muy diferentes de la célula diana natural y estas diferencias afectan algo a los resultados. Por ejemplo, puede evitarse que la curva de la razón de células efectoras heterólogas (E) con respecto a células diana (T) (razón E:T) sea completamente cero a medida que aumenta el número de células diana cuando cambia la razón E:T. Este problema se soluciona mediante el uso de una célula diana recombinante en la que el gen, que codifica el antígeno específico reconocido por el anticuerpo monoclonal, se ha invalidado.

Una característica preferida adicional de la presente invención son células diana recombinantes que tienen una expresión constante potenciada del antígeno frente al que el anticuerpo es específico como se divulga en el documento WO 2018/065401, se cotransfectan con una o más moléculas coestimuladoras tales como CD80 o CD86, permitiendo así obtener un rango dinámico mucho mayor y una sensibilidad potenciada para un ensayo de ADCC o ADCP.

Además, las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y el antígeno específico se expresan a niveles altos constantes que no varían a medida que proliferan las células o en función de las condiciones de cultivo como es el caso para las células de tipo silvestre, proporcionando por tanto una precisión mejorada del ensayo. Esto permite que se determine la detección de diferencias sutiles en la actividad ADCC o ADCP de los anticuerpos candidatos. Otra ventaja de las células diana recombinantes es que pueden proporcionarse en formato de congelación, descongelación y uso para una mayor facilidad de uso que la recolección o el cultivo de células diana de sujetos humanos o el cultivo de líneas celulares diana en el laboratorio. El uso de tales células recombinantes evita la variabilidad que estará presente inherentemente en las células diana obtenidas de individuos normales o células cultivadas *in vitro* ya que tales células de tipo silvestre tendrán una expresión variable del antígeno de interés dependiendo del estado de maduración, la fase del ciclo celular o las condiciones de cultivo. El uso de un control positivo recombinante elimina esta variabilidad.

Una característica preferida adicional de la presente invención es un formato de descongelación y uso que comprende viales de células efectoras y viales de células diana congelados por separado usando técnicas convencionales. Tras la descongelación, las células efectoras y las células diana se mezclan a la razón E:T óptima y se incuban durante el tiempo apropiado en una placa de microtitulación de múltiples pocillos de lados blancos en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo que va a analizarse. La actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por anticuerpos (FL) y la expresión constitutiva de luciferasa de Renilla (RL) se cuantifican entonces secuencialmente en el mismo pocillo de una placa de microtitulación en un luminómetro usando un sustrato de luciferasa doble. Los resultados se expresan como unidades relativas de luciferasa (RLU) y se presentan en forma de un gráfico logístico de 4 parámetros (4PL) como se muestra en los siguientes ejemplos.

Una característica preferida adicional de la presente invención es un único vial congelado que contiene tanto células efectoras como células diana a la razón E:T óptima para un anticuerpo monoclonal particular tal como rituximab de

manera que todo lo que tiene que hacer el cliente es añadir fármaco a una concentración deseada, incubar y tomar una lectura. También se suministra un único vial congelado que contiene tanto células efectoras como células diana de control negativo a la razón E:T óptima para un anticuerpo monoclonal particular. En consecuencia, según la invención, la razón E:T está en el intervalo de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 1:1. Preferiblemente, la razón es, por ejemplo, de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 2:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente por ejemplo 1,5:1, o aproximadamente 1:1. Un formato de este tipo evita la necesidad de que el usuario del kit o el método determine la razón E:T óptima y otros parámetros de ensayo para un anticuerpo monoclonal particular.

En un aspecto, la invención se refiere a un método según la reivindicación 13.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la reivindicación 14.

En una realización adicional de la presente invención, para facilitar la cuantificación de la actividad ADCC o ADCP de anticuerpos que se dirigen a CD20, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80 y/o CD86 en células que expresan CD20. En una realización preferida de la presente invención, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 o CD80 y CD86 en células diana que expresan un alto nivel constante de expresión de CD20 tales como las divulgadas en el documento WO 2018/065401.

En una realización adicional de la presente invención, para facilitar la cuantificación de la actividad ADCC o ADCP de anticuerpos que se dirigen al receptor HER2, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 o CD80 y CD86 en células que expresan ERBB2. En una realización preferida de la presente invención, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, o CD80 y CD86 en células diana que expresan un alto nivel constante de expresión de ERBB2, tales como las divulgadas en el documento WO 2018/065401.

En una realización adicional de la presente invención, para facilitar la cuantificación de la actividad ADCC o ADCP de anticuerpos que se dirigen al receptor EGFR, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, o CD80 y CD86 en células que expresan EGFR. En una realización preferida de la presente invención, se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 o CD80 y CD86 en células diana que expresan un alto nivel constante de expresión de EGFR tales como las divulgadas en el documento WO 2018/065401.

En una realización adicional de la presente invención, para facilitar la cuantificación de la actividad ADCC de infliximab o cualquier otro anticuerpo anti-TNF- α o proteína de fusión de Fc tal como por ejemplo etanercept (Enbrel®), se sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, o CD80 y CD86 en células diana tales como las divulgadas en el documento WO 2018/065401 que expresan TNF α (mTNF α) unido a membrana ya que la cuantificación de la actividad ADCC de los antagonistas de TNF α requiere una célula diana que expresa TNF α unido a membrana. Aunque el TNF α está inicialmente unido a la membrana, posteriormente se escinde por la proteasa ADAM17 (TACE). Por lo tanto, para establecer una línea celular que expresara TNF α no escindible unido a membrana, se usó mutagénesis dirigida al sitio para mutar el sitio de escisión de proteasa. El TNF α no escindible expresado en la superficie de una célula se unirá, sin embargo, al receptor TNF α RII presente en la superficie de las células vecinas, lo que resulta en la muerte celular y dificulta el establecimiento de una línea celular permanente. Por lo tanto, o con el fin de obviar tales dificultades, el receptor TNF α RII se invalidó usando edición genómica y en el control negativo se invalidó la expresión de TNF α usando edición genómica pero no el receptor TNF α RII como se divulga en el documento WO 2018/065401.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una célula de acuerdo con la invención como se divulga en la reivindicación 15, en un ensayo biológico.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una célula de acuerdo con la invención como se divulga en la reivindicación 16, en diagnóstico o un método de diagnóstico.

La presente invención también permite el uso de una célula de acuerdo con la invención en un ensayo para potenciar el rango dinámico y/o aumentar la sensibilidad en el ensayo.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de una célula de acuerdo con la invención en un ensayo para potenciar el rango dinámico y/o aumentar la sensibilidad en el ensayo, en donde dichas células se usan para evaluar la actividad ADCC y/o ADCP de un anticuerpo como se divulga en la reivindicación 17.

Definiciones

Los términos "invalidado" o "silenciado" usados indistintamente en el presente documento se refieren a la inactivación de un gen particular para en última instancia cambiar el fenotipo de una célula. Efectivamente, el término pretende abarcar hacer que un gen no sea funcional. Un ejemplo puede ser la invalidación de un determinado gen para eliminar la expresión de un receptor de superficie celular.

El término “++” en relación con una “célula ++” pretende significar una célula diana en la que se sobreexpresa el antígeno (diana farmacológica). La terminología se usa indistintamente en el presente documento con “T+”. Además, cuando la expresión se usa junto con un receptor o antígeno tal como, por ejemplo, CD20⁺⁺, pretende significar que CD20 se sobreexpresa en la célula en cuestión. Como ejemplo sin pretender limitar el alcance de la invención, en el caso de CD20, los niveles de expresión aumentan unas 16 veces en las células diana CD20⁺⁺ en relación con las células Raji CD20⁺ de tipo silvestre como se divulga en el documento WO 2018/065401.

Los términos erbB2 y ERBB2 son intercambiables e indican el antígeno reconocido, por ejemplo, por transtuzumab.

El término “-/-” en relación con “célula -/-” pretende significar una célula diana en la que no se expresa el antígeno (diana farmacológica), es decir, en donde el gen relevante se ha desactivado (invalidado) para silenciar la expresión del antígeno/receptor en cuestión. La terminología se usa indistintamente en el presente documento con “T-”. En consecuencia, las células ya no expresan niveles detectables del antígeno específico reconocido por el anticuerpo ya que el gen que codifica el antígeno específico se ha vuelto no funcional. En el contexto de la presente invención, esto puede considerarse una célula diana de control.

El término “E” pretende significar “células efectoras” y particularmente células efectoras de acuerdo con la invención. El término “célula efectora” pretende significar cualquier célula de cualquier tipo que responda activamente a un estímulo y efectúe algún cambio (lo provoca). Un ejemplo de este tipo son las células citolíticas inducidas por citocinas, células efectoras citotóxicas fuertemente productivas que son capaces de lisar células tumorales. En un ejemplo adicional y en el contexto de la presente invención, se pretende que una célula efectora signifique cualquier célula que tenga receptores Fc gamma (FcγR o FCGR) en la superficie de dicha célula que se unen a la región Fc de un anticuerpo, en donde el propio anticuerpo es específicamente capaz de unirse a una célula diana.

El término “T” pretende significar una “célula diana”, es decir, cualquier célula que tenga un receptor/antígeno específico que reaccione con una hormona, antígeno, anticuerpo, antibiótico, células T sensibilizadas u otra sustancia específica. En relación con esto, el término “(T+)” pretende significar células diana positivas para antígeno y, en consecuencia, una célula que expresa un antígeno en su superficie y que permite la unión de un anticuerpo. Por el contrario, el término “(T-)” pretende significar una célula diana negativa para antígeno (célula diana de control) y, en consecuencia, una célula que no expresa un antígeno en su superficie y, por lo tanto, que no puede reaccionar con un anticuerpo. Dicho de otra manera, las células antígeno -/- (o células T) no expresan niveles detectables del antígeno específico reconocido por el anticuerpo que está sometiéndose a prueba para determinar la actividad ADCC ya que el gen que codifica el antígeno específico se ha vuelto no funcional. Específicamente, las células diana usadas de acuerdo con la invención son el mismo tipo de células, lo que contrasta con los métodos conocidos que habitualmente emplean un tipo de célula como célula T+ y emplean otro tipo de células como célula T-. Dicho de otra manera, una célula diana de control homóloga que es exactamente la misma célula idéntica en todos los aspectos que la célula diana positiva para antígeno (T+), excepto porque no expresa el antígeno específico reconocido por el anticuerpo que está sometiéndose a ensayo. Como se mencionó anteriormente, esto contrasta con el uso de una célula T (linfocito T), por ejemplo, que a menudo se usa como célula diana de control para la cuantificación de la actividad de rituximab usando células diana de células B que expresan CD20.

Ejemplos

Ejemplo 1: Establecimiento de una línea celular efectora sensible a CD16 modificada por ingeniería genética que sobreexpresa el receptor coestimulador CD28

Células Jurkat (ATCC® TIB-152) que expresan o bien la variante V o bien la variante F de CD16A funcionalmente unida al gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFκB y STAT5 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con el gen que codifica el receptor coestimulador CD28 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y un anticuerpo monoclonal anti-CD28 (ImmunoTools, n.º de catálogo 21270280) junto con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón FITC (ImmunoTools, n.º de catálogo 22549913). Las células también se transfectaron con el gen que codifica la luciferasa de Renilla (RL) bajo el control de un promotor constitutivo que permite normalizar la actividad de FL activada por ADCC en relación con la expresión constitutiva de la actividad de RL, lo que hace que los resultados sean independientes de la concentración celular. Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células diana de ADCC que sobreexpresan CD20 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y rituximab y luego se subclonaron. Se aisló un subclón estable y se demostró que expresa una señal de FL potenciada cuando se usa para evaluar la actividad ADCC de un anticuerpo junto con células diana recombinantes que expresan un antígeno reconocido específicamente por un anticuerpo y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras incluidas CD80 y/o CD86 como se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2: Establecimiento de una línea celular efectora sensible a CD16 modificada por ingeniería genética que sobreexpresa el receptor coestimulador CD137 (4-1BB)

Células Jurkat (ATCC® TIB-152) que expresan o bien la variante V o bien la variante F de CD16A funcionalmente unida al gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con el gen que codifica el receptor coestimulador CD137 (4-1BB) usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los resultados de una serie de experimentos de transfección transitoria muestran que la expresión de CD137 en células efectoras Jurkat que expresan el receptor FcγRIIIA funcionalmente unido al gen indicador FL regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 previamente divulgados en el documento WO 2018/065401 cuando se usa junto con células diana HEK293 que sobreexpresan ERBB2 y una o más moléculas coestimuladoras aumentaron notablemente la señal de FL de un ensayo de ADCC usando trastuzumab (figura 1A). Después de la transfección estable de las células efectoras divulgadas en el documento WO 2018/065401 con el gen que codifica los clones positivos para CD137, se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y un anticuerpo monoclonal anti-CD137 conjugado con Alexa-488 (n.º de catálogo de R & D Systems FAB838G). Las células también se transfectaron con el gen que codifica la luciferasa de Renilla (RL) bajo el control de un promotor constitutivo que permite normalizar la actividad de FL activada por ADCC en relación con la expresión constitutiva de la actividad de RL, lo que hace que los resultados sean independientes de la concentración celular. Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células diana de ADCC que sobreexpresan ERBB2 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y trastuzumab y luego se subclonaron. Se aisló un subclón estable y se demostró que expresa una señal de FL potenciada cuando se usa para evaluar la actividad ADCC de un anticuerpo junto con células diana recombinantes que expresan un antígeno reconocido específicamente por un anticuerpo y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras incluidas CD80 y/o CD86 como se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 3: Establecimiento de una línea celular efectora sensible a CD16A modificada por ingeniería genética que sobreexpresa la cadena de señalización zeta sola o junto con el receptor coestimulador CD28

Para optimizar la señalización de ITAM del receptor FcγRIIIA y, por lo tanto, aumentar el rango dinámico y la sensibilidad de un ensayo de ADCC, células efectoras Jurkat expresan el receptor FcγRIIIA funcionalmente unido al gen indicador FL regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, o las células efectoras que sobreexpresan CD28 descritas en el ejemplo 1, se transfectaron con la molécula de señalización zeta transmembrana (CD247) asociada con CD3 que contiene tres motivos de activación ITAM (4) usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los resultados de una serie de experimentos de transfección transitoria muestran que la sobreexpresión de la molécula de señalización transmembrana zeta sola (figura 1B), o junto con CD28 en células efectoras Jurkat que expresan el receptor FcγRIIIA funcionalmente unido al gen indicador FL regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 cuando se usan junto con células diana HEK293 que sobreexpresan ERBB2 solo o junto con CD86 aumentó notablemente la señal de FL de un ensayo de ADCC usando trastuzumab (figura 1B). Después de la transfección estable de las células efectoras divulgadas en el documento WO 2018/065401 con la molécula de señalización zeta transmembrana (CD247) usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311), se enriquecieron los clones positivos usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpo monoclonal anti-CD247 marcado con FITC (AbCam, n.º de catálogo H46-968). Las células también se transfectaron con el gen que codifica la luciferasa de Renilla bajo el control de un promotor constitutivo que permite normalizar la actividad de FL activada por ADCC en relación con la expresión constitutiva de la actividad de RL, lo que hace que los resultados sean independientes de la concentración celular. Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células diana de ADCC que sobreexpresan ERBB2 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y trastuzumab y luego se subclonaron. El uso de dichas células dio como resultado una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados, cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de un anticuerpo junto con células diana recombinantes que expresan un antígeno reconocido específicamente por un anticuerpo y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras que incluyen CD80 y/o CD86.

Ejemplo 4: Establecimiento de una línea celular efectora sensible a CD32 modificada por ingeniería genética

Para optimizar la señalización del receptor FcγRIIA y, por lo tanto, el rango dinámico y la sensibilidad de un ensayo de ADCP, se transfectaron células Jurkat con el receptor FcγRIIA funcionalmente unido al gen indicador FL regulado por un promotor quimérico sintético novedoso que contiene sitios de unión para NF-AT, AP1, NFkB y STAT5 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpo monoclonal anti-CD32 marcado con FITC (AbCam, n.º de catálogo ab30356). Las células también se transfectaron con el gen que codifica la luciferasa de Renilla (RL) bajo el control de un promotor constitutivo que permite normalizar la actividad de FL activada por ADCP en relación con la expresión constitutiva de la actividad de RL, lo que hace que los resultados sean independientes de la concentración celular. Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCP en presencia de células diana que sobreexpresan CD20 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y rituximab. El uso de dichas células efectoras para evaluar la actividad

ADCP de un anticuerpo junto con células diana recombinantes que expresan un antígeno reconocido específicamente por un anticuerpo y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras incluidas CD80 y/o CD86 dio como resultado un ensayo de ADCP con una señal, rango dinámico y sensibilidad potenciados con respecto a células que expresan Fc γ RIIA funcionalmente unido al gen indicador FL bajo el control de un promotor quimérico NFAT como se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 5: Establecimiento de una línea celular diana modificada por ingeniería genética que expresa altos niveles constantes de CD20 y una o más moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Células Raji (ATCC[®] CCL-86) que sobreexpresan un alto nivel constante de CD20 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con la molécula coestimuladora CD80 o CD86, o tanto CD80 como CD86 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpos monoclonales anti-CD80 marcado con ficoeritrina (ImmunoTools, n.º de catálogo 21270804) o anti-CD86 marcado con FITC (ImmunoTools, n.º de catálogo 21480863). Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células efectoras de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y rituximab y luego se subclonaron. Se aislaron subclones adecuados, se caracterizaron y se propagaron dando lugar a líneas celulares diana CD20⁺⁺ que sobreexpresan CD80 o CD86, o tanto CD80 como CD86.

Se congelaron por separado viales de células efectoras iLite[®] divulgadas en el documento WO 2018/065401 y viales de células diana CD20⁺⁺ que sobreexpresan CD80 o CD86, o tanto CD80 como CD86, usando técnicas convencionales. Tras la descongelación, se mezclaron las células efectoras y las células diana a una razón E:T de 3:1 y se incubaron durante 4 horas en una placa de microtitulación de lados blancos de 96 pocillos (Perkin Elmer 6005181) en presencia de concentraciones crecientes de rituximab en medio de cultivo RPMI 1640 + suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Entonces se determinó la actividad de FL usando el sustrato de luciferasa doble Dual Glo (Promega 22920) y se cuantificó la emisión de luz en un luminómetro (GloMax, Promega) y se expresó como unidades relativas de luciferasa (RLU). Los resultados se presentan en forma de un gráfico logístico de 4 parámetros (4PL) como se muestra en la figura 2A. La tabla asociada a las figuras 2A y la tabla 1 resumen los parámetros principales de un gráfico 4PL para las células efectoras iLite[®] y una célula diana dada. Cuando se usaron células diana CD20⁺⁺ que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, la señal de FL máxima del ensayo de ADCC aumentó usando células diana que sobreexpresan CD80, aunque tanto el rango dinámico como la sensibilidad se redujeron en relación con el uso de células diana que sobreexpresan CD20 solo. De manera similar, la sobreexpresión de CD86 solo o junto con CD86 redujo el rango dinámico y la sensibilidad de un ensayo de ADCC cuando se usó junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 (figura 2A).

Se observaron una ausencia de aumento en la señal de FL máxima y un rango dinámico reducido cuando se usaron células diana CD20⁺⁺ que sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80 o CD86 para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con células efectoras que expresan la variante F de CD16A previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 (figura 2B). Además, la sensibilidad del ensayo o bien no se vio afectada significativamente o bien disminuyó (figura 2B).

La observación de que la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células diana Raji que sobreexpresan CD20 reduce la sensibilidad y el rango dinámico de un ensayo para evaluar la actividad ADCC de rituximab en relación con un ensayo de ADCC usando células diana Raji que sobreexpresan CD20 solo está muy probablemente relacionado con los altos niveles endógenos de expresión de CD80 y CD86 en células Raji parentales (5) y el aumento de los niveles de expresión aún más probablemente induce la modulación por CTLA-4 de la interacción CD80-CD86 de células efectora-células diana CD28 (5).

Dichas células diana Raji que sobreexpresan CD20 solo o junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 juntos cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 dieron como resultado un ensayo de ADCC con un rango dinámico y sensibilidad notablemente potenciados en relación con un ensayo de ADCC que usa células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3A). La señal de FL máxima fue, sin embargo, menor que la observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3A). Sin embargo, se observaron una ausencia de aumento en la señal de FL máxima y un rango dinámico reducido y sensibilidad reducida cuando se usaron células diana CD20⁺⁺ que sobreexpresan las moléculas coestimuladoras CD80 o CD86 para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con células efectoras que expresan la variante F de CD16A previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 en relación con los observados usando células diana CD20⁺⁺ solas (figura 3B), tanto el rango dinámico como la sensibilidad del ensayo fueron, no obstante, superiores a los observados usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3B).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante V de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con células diana Raji que sobreexpresan CD20 junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86, dio como resultado un ensayo de ADCC

con una señal de FL aumentada (figura 4A, tabla 1). La sensibilidad del ensayo de ADCC o bien se redujo marginalmente o bien no cambió significativamente (figura 4A, tabla 1), mientras que el rango dinámico del ensayo de ADCC se redujo cuando se usaron células diana que sobreexpresan CD80, o CD86, o bien solo o bien junto con CD80 en relación con las células diana que sobreexpresan CD20 solo, debido a un aumento general en la señal de FL tanto en las muestras de control no tratadas como en las muestras tratadas con rituximab (figura 4A, tabla 1).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante F de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con células diana Raji que sobreexpresan CD20 junto con CD80, o CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL aumentada en relación con el uso de células diana que sobreexpresan CD20 solo (figura 4B). La sensibilidad del ensayo de ADCC o bien no se vio afectada o bien se redujo ligeramente, sin embargo, en relación con el uso de células diana que sobreexpresan CD20 solo (figuras 3B y 4B), mientras que el rango dinámico del ensayo de ADCC se redujo cuando se usaron células efectoras que sobreexpresan CD28 y células diana que sobreexpresan o bien CD80, o bien CD86 en relación con células diana que sobreexpresan CD20 solo, debido a un aumento general en la señal de FL tanto en las muestras de control no tratadas como en las muestras tratadas con rituximab (figuras 3B y 4B).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante V de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de rituximab junto con células diana Raji que sobreexpresan o bien CD20 solo o bien junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con un rango dinámico mejorado y una sensibilidad notablemente mejorada en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3A). La señal de FL máxima fue, sin embargo, menor que la observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3A).

El uso de las células efectoras Jurkat que expresan la variante F de CD16A y que sobreexpresan CD28 como se describe en el ejemplo 1 junto con células diana Raji que sobreexpresan CD20 junto con CD80, o CD86, o CD80 y CD86 para evaluar la actividad ADCC de rituximab dio como resultado un ensayo de ADCC con un mayor rango dinámico y sensibilidad en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT que expresan la variante F de CD16A y células diana Raji de tipo silvestre (figura 3B). Por el contrario, la señal de FL máxima del ensayo fue mayor cuando se usaron células efectoras sensibles a NFAT que expresan la variante F de CD16A y células diana Raji de tipo silvestre (figura 5B).

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descrita en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usaron para evaluar la actividad ADCP de rituximab junto con células diana Raji recombinantes que sobreexpresan CD20 junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo ADCP usando dichas células efectoras y células diana que sobreexpresan CD20 solo.

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descrita en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usaron para evaluar la actividad ADCP de rituximab junto con células diana Raji recombinantes que sobreexpresan CD20 junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando células efectoras que expresan FcγRIIA funcionalmente unido al gen indicador FL bajo el control de un promotor quimérico NFAT y células diana Raji de tipo silvestre.

Ejemplo 6: Establecimiento de una línea celular modificada por ingeniería genética que expresa altos niveles constantes de erbB2 y una o más moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Células HEK293 (ATCC® CRL 1573) que sobreexpresan un alto nivel constante de erbB2 previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con la molécula coestimuladora CD80 o CD86 o tanto CD80 como CD86 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpos monoclonales anti-CD80 marcado con ficoeritrina (ImmunoTools, n.º de catálogo 21270804) o anti-CD86 marcado con FITC (ImmunoTools, n.º de catálogo 21480863). Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células efectoras de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y trastuzumab y luego se subclonaron. Se aislaron subclones adecuados, se caracterizaron y se propagaron dando lugar a líneas celulares diana erbB2⁺⁺ que sobreexpresan CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86.

Se congelaron por separado viales de células efectoras iLite® divulgadas en el documento WO 2018/065401 y viales de células diana erbB2⁺⁺ que sobreexpresan CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 usando técnicas convencionales. Tras la descongelación, se mezclaron células efectoras y células diana a una razón E:T de 4:1 y se incubaron durante 6 horas en una placa de microtitulación de lados blancos de 96 pocillos (Perkin Elmer 6005181) en presencia de concentraciones crecientes de trastuzumab en medio de cultivo RPMI 1640 + suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Entonces se determinó la actividad de FL usando el sustrato de luciferasa doble Dual Glo (Promega 22920) y se cuantificó la emisión de luz en un luminómetro (GloMax, Promega) y se expresó como unidades relativas de luciferasa (RLU). Los resultados se presentan en forma de un gráfico logístico de 4 parámetros (4PL) como se muestra en las figuras 6 a 9. La tabla asociada a las figuras y la tabla 2 resumen los parámetros principales de un gráfico 4PL

para las células efectoras iLite® y las células diana erbB2⁺.

Cuando dichas células que sobreexpresan erbB2 se usaron para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, el aumento en la señal de FL máxima y el rango dinámico del ensayo de ADCC fueron más pronunciados usando células diana que sobreexpresan erbB2 y CD86 (figura 6A). También se observó un aumento de la señal de FL y el rango dinámico usando células diana que sobreexpresan erbB2 y CD80 o erbB2 y CD80 y CD86 en relación con células que sobreexpresan erbB2 solo (figura A, tabla 1). La sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80, o CD86, o CD80 y CD86 también aumentó la sensibilidad del ensayo. El mayor aumento en la sensibilidad se observó usando células diana que sobreexpresan erbB2 y CD86 seguido de células diana que expresan erbB2 y CD80, mientras que solo se observó un aumento modesto en la sensibilidad usando células diana que sobreexpresan erbB2 y tanto CD80 como CD86 (figura 6A, tabla 2).

Cuando se usan células efectoras Jurkat que expresan la variante F de CD16A como se divulga en el documento WO 2018/065401 para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan tanto erbB2 como CD80, o erbB2 y CD86, dieron como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico notablemente aumentados (figura 6B). La sensibilidad del ensayo de ADCC también aumentó usando células diana que sobreexpresan tanto erbB2 como CD80, pero disminuyó cuando se usaron células diana que sobreexpresan erbB2 y CD86 (figura 6B).

Dichas células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 solo o junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 juntos, cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, dieron como resultado un ensayo de ADCC con un rango dinámico y una sensibilidad notablemente potenciados en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre (figura 7A). La señal de FL máxima también aumentó en relación con la observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana Raji de tipo silvestre cuando las células diana sobreexpresan erbB2 y CD86, o tanto CD80 como CD86 fueron para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 (figura 7A).

El uso de células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 solo o junto con CD80, o CD86 para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con las células efectoras de la variante F de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico notablemente potenciados en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT que expresan la variante F de CD16A y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre (figura 7B). La sensibilidad del ensayo de ADCC también aumentó usando células diana que sobreexpresan tanto erbB2 como CD80, pero no cuando se usaron células diana que expresan tanto erbB2 como CD86 (figura 7B).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante V de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 junto con CD80, o CD86, o CD80 junto con CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad aumentados con respecto al uso de células efectoras Jurkat que sobreexpresan CD28 y células diana que sobreexpresan erbB2 solo (figura 8A, tabla 2).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante F de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 junto con CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico aumentados pero sensibilidad reducida (figura 8B).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante V de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 junto con CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad aumentados con respecto a una ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT que expresan la variante V de CD16A y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre como se muestra en la figura 9A.

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante F de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan erbB2 junto con CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico aumentados pero una sensibilidad reducida en relación con una ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT que expresan la variante F de CD16A y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre (figura 9B).

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de trastuzumab junto con células diana HEK293 recombinantes que sobreexpresan erbB2 junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCC usando dichas células efectoras y células diana que sobreexpresan erbB2 solo.

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usan para evaluar la actividad ADCP de trastuzumab junto con células diana HEK293 recombinantes que sobreexpresan erbB2 junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando células efectoras que expresan Fc γ RIIA funcionalmente unido al gen indicador FL bajo el control de un promotor quimérico NFAT y células diana SK-BR-3 de tipo silvestre.

Ejemplo 7: Establecimiento de una línea celular diana modificada por ingeniería genética que expresa altos niveles contantes de EGFR y una o más moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Células HEK293 (ATCC[®] CRL 1573) que sobreexpresan un alto nivel constante de EGFR previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con la molécula coestimuladora CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpos monoclonales anti-CD80 marcados con ficoeritrina (ImmunoTools, n.º de catálogo 21270804) o anti-CD86 marcado con FITC (ImmunoTools, n.º de catálogo 21480863). Se aislaron clones estables y se caracterizaron para la actividad ADCC en presencia de las células efectoras de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y cetuximab y luego se subclonaron. Se aislaron subclones adecuados, se caracterizaron y se propagaron dando lugar a líneas celulares diana EGFR⁺⁺ que sobreexpresan CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86. Se congelaron por separado viales de células efectoras iLite[®] divulgadas en el documento WO 2018/065401 y viales de células diana EGFR⁺⁺ que sobreexpresan CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 usando técnicas convencionales. Tras la descongelación, se mezclaron células efectoras y células diana se mezclaron a una razón E:T de 4:1 y se incubaron durante 6 horas en una placa de microtitulación de lados blancos de 96 pocillos (Perkin Elmer 6005181) en presencia de concentraciones crecientes de cetuximab en medio de cultivo RPMI 1640 + suero bovino fetal (FBS) al 10%. La actividad de FL se determinó luego usando los sustratos de luciferasa dobles Dual Glo (Promega 22920) y se cuantificó la emisión de luz en un luminómetro (GloMax, Promega) y se expresó como unidades relativas de luciferasa (RLU). Los resultados se presentan en forma de un gráfico logístico de 4 parámetros (4PL) como se muestra en las figuras 10 a 13. La tabla asociada a las figuras y la tabla 3 resumen los parámetros principales de un gráfico 4PL para las células efectoras iLite[®] y las células diana EGFR⁺⁺.

Cuando dichas células diana se usaron para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, la señal de FL máxima y el rango dinámico del ensayo de ADCC fueron más pronunciados usando células diana que sobreexpresan tanto CD80 como CD86. También se observó un aumento de la señal de FL y el rango dinámico usando células diana que sobreexpresan CD80 o CD86 en relación con células que sobreexpresan EGFR solo (figura 10A, tabla 3). La sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 o CD86 también aumentó la sensibilidad del ensayo, mientras que la sobreexpresión de tanto CD80 como CD86 juntos disminuyó la sensibilidad del ensayo (figura 10A, tabla 3).

El uso de células diana que sobreexpresan tanto EGFR como CD86 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de ADCC que expresan la variante F de CD16A previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico aumentados en relación con el uso de células diana que sobreexpresan EGFR solo, aunque la sensibilidad del ensayo no cambió significativamente (figura 10B).

El uso de células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD80, CD86 o tanto CD80 como CD86 juntos para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, dio como resultado un ensayo de ADCC con un rango dinámico notablemente potenciado y sensibilidad potenciada en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre. Por el contrario, la señal de FL máxima observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre fue mayor que la observada con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y células diana que sobreexpresan EGFR y una o más moléculas coestimuladoras (figura 11A, tabla 3).

El uso de células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD86 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de ADCC que expresan la variante F de CD16A previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, dio como resultado un ensayo de ADCC con una sensibilidad potenciada pero un rango dinámico sin cambios en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre. Por el contrario, la señal de FL máxima observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre fue mayor que la observada con las células efectoras de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 y células diana que sobreexpresan EGFR y una o más moléculas coestimuladoras (figura 11B).

El uso de células efectoras Jurkat recombinantes que expresan la variante V de CD16A y que sobreexpresan el receptor coestimulador CD28 como se describe en el ejemplo 1 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico notablemente aumentados en relación con

un ensayo de ADCC usando células efectoras Jurkat que expresan niveles endógenos de CD28 como se divulga en el documento WO 2018/065401 y células diana que sobreexpresan EGFR solo (figuras 11A y 12A, tabla 3). La sensibilidad del ensayo de ADCC también aumentó en relación con el uso de células efectoras que expresan niveles endógenos de CD28 cuando se usan células diana que sobreexpresan CD80, o CD86, pero solo marginalmente cuando se usan células diana que sobreexpresan tanto EGFR como CD80 junto con CD86 (figura 12A, tabla 3).

El uso de células efectoras Jurkat que expresan la variante F de CD16A y que sobreexpresan el receptor coestimulador CD28 como se describe en el ejemplo 1 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL aumentada, rango dinámico aumentado y sensibilidad aumentada en relación con células diana que sobreexpresan EGFR solo (figuras 10B y 12B).

El uso de células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD86 o tanto CD80 como CD86 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de la variante V de ADCC que sobreexpresan el receptor coestimulador CD28 como se describe en el ejemplo 1 dio como resultado un ensayo de ADCC con un rango dinámico potenciado en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre. La sensibilidad del ensayo también aumentó usando células diana que sobreexpresan tanto EGFR como CD80, CD86, o tanto CD80 como CD86 (figura 13A). Por el contrario, la señal de FL máxima observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre fue mayor que la observada con las células efectoras de la variante V de ADCC que sobreexpresan EGFR y una o más moléculas coestimuladoras (figura 13 A, tabla 3).

El uso de células diana HEK293 que sobreexpresan EGFR junto con CD86 para evaluar la actividad ADCC de cetuximab junto con las células efectoras de ADCC que expresan la variante F de CD16A y que sobreexpresan CD28 como se describe en el ejemplo 1, dio como resultado un ensayo de ADCC con una sensibilidad aumentada pero un rango dinámico sin cambios en relación con un ensayo de ADCC usando células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre. Por el contrario, la señal de FL máxima observada con células efectoras sensibles a NFAT y células diana A431 de tipo silvestre fue mayor que la observada con las células efectoras de la variante F de ADCC que sobreexpresan CD28 como se describe en el ejemplo 1 y células diana que sobreexpresan EGFR y CD86 (figura 11B).

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciadas cuando se usan para evaluar la actividad ADCP de cetuximab junto con células diana HEK293 recombinantes que sobreexpresan EGFR junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando dichas células efectoras y células diana que sobreexpresan EGFR solo.

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 3 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usan para evaluar la actividad ADCP de cetuximab junto con células diana HEK293 recombinantes que sobreexpresan EGFR junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando células efectoras que expresan FcγRIIA funcionalmente unido al gen indicador FL bajo el control de un promotor quimérico NFAT y células diana A431 de tipo silvestre.

Ejemplo 8: Establecimiento de una línea celular diana modificada por ingeniería genética que expresa altos niveles constantes de mTNF α y una o más moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Células HEK293 (ATCC® CRL 1573) que sobreexpresan un alto nivel constante de TNF α (mTNF α) no escindible unido a membrana previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 se transfectaron con la molécula coestimuladora CD80 o CD86 o tanto CD80 como CD86 usando el reactivo de transfección FuGENE HD (n.º de catálogo de Promega E2311). Los clones positivos se enriquecieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia y anticuerpos monoclonales anti-CD80 marcado con ficoeritrina (ImmunoTools, n.º de catálogo 21270804) o anti-CD86 marcado con FITC (ImmunoTools, n.º de catálogo 21480863). Se aislaron clones estables y se caracterizaron por la actividad ADCC en presencia de las células efectoras ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 e infliximab y luego se subclonaron. Se aislaron subclones adecuados, se caracterizaron y se propagaron dando lugar a líneas celulares diana de mTNF α que sobreexpresan CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86. Se congelaron por separado viales de células efectoras iLite® divulgadas en el documento WO 2018/065401 y viales de células diana mTNF α ⁺⁺ que sobreexpresan CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 usando técnicas convencionales. Tras la descongelación, se mezclaron células efectoras y células diana a una razón E:T de 6:1 y se incubaron durante 6 horas en una placa de microtitulación de lados blancos de 96 pocillos (Perkin Elmer 6005181) en presencia de concentraciones crecientes de infliximab en medio de cultivo RPMI 1640 + suero bovino fetal (FBS) al 10%. La actividad de FL se determinó luego usando el sustrato de luciferasa doble Dual Glo y se cuantificó la emisión de luz en un luminómetro y se expresó como unidades relativas de luciferasa (RLU). Los resultados se presentan en forma de un gráfico logístico de 4 parámetros (4PL) como se muestra en las figuras 6 a 9. La tabla asociada a las figuras y la tabla 4 resumen los parámetros principales de un gráfico 4PL para las células efectoras iLite® y las células diana mTNF α ⁺⁺.

Cuando dichas células diana se usaron para evaluar la actividad ADCC de infliximab junto con las células efectoras

de la variante V de ADCC previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401, la señal de FL máxima y el rango dinámico del ensayo de ADCC fueron más pronunciados usando células diana que sobreexpresan CD80 y CD86. También se observó un aumento de la señal de FL y el rango dinámico usando células diana que sobreexpresan CD80 o CD86 en relación con células que sobreexpresan mTNF α solo (figura 14A, tabla 4). La sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 también aumentó la sensibilidad del ensayo, pero no la sobreexpresión de CD86 o CD80 y CD86 juntas (figura 14A, tabla 4).

El uso de células diana que expresan mTNF α y que sobreexpresan una o más moléculas coestimuladoras para evaluar la actividad ADCC de infliximab junto con las células efectoras de ADCC que expresan la variante F de CD16A previamente divulgadas en el documento WO 2018/065401 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL y un rango dinámico aumentados que fue más pronunciado usando células diana que sobreexpresan CD86 (figura 14B). También se observó un aumento de la señal de FL y el rango dinámico usando células diana que sobreexpresan CD80 en relación con células que sobreexpresan mTNF α solo (figura 14B). La sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 disminuyó ligeramente la sensibilidad del ensayo. La disminución en la sensibilidad fue más pronunciada en células diana que sobreexpresan tanto mTNF α como CD86 (figura 14B).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en la variante V de células efectoras Jurkat recombinantes como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de infliximab junto con células diana HEK293 que expresan mTNF α junto con CD80, o CD86 o tanto CD80 como CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL aumentada y una sensibilidad ligeramente aumentada en el caso de células diana que sobreexpresan la molécula coestimuladora CD80 mientras que la sensibilidad del ensayo se redujo usando células diana que sobreexpresan mTNF α junto con CD86 o CD80 y CD86 (figura 17A, tabla 4). El rango dinámico del ensayo de ADCC no se vio afectado significativamente usando células diana que expresan tanto mTNF α como CD80 o disminuyó usando células diana que expresan mTNF α y CD86 o mTNF α y tanto CD80 como CD86 en relación con el uso de células efectoras que expresan niveles endógenos de CD28 cuando se usan células diana que sobreexpresan CD80, CD86 o CD80 junto con CD86, debido a un aumento general en la señal de FL tanto en las muestras de control no tratadas como en las muestras tratadas con infliximab (figura 17, tabla 4).

La sobreexpresión del receptor coestimulador CD28 en las células efectoras Jurkat recombinantes que expresan la variante F de CD16A como se describe en el ejemplo 1 cuando se usan para evaluar la actividad ADCC de infliximab junto con células diana HEK293 que expresan mTNF α junto con CD80 o CD86 dio como resultado un ensayo de ADCC con una señal de FL aumentada en relación con el uso de células diana que expresan mTNF α solo (figura 17B). Por el contrario, la sensibilidad del ensayo no se vio afectada significativamente y el rango dinámico del ensayo de ADCC disminuyó en relación con el uso de células efectoras que expresan niveles endógenos de CD28 cuando se usan células diana que sobreexpresan CD86, debido a un aumento general en la señal de FL tanto en las muestras de control no tratadas como en las muestras tratadas con infliximab (figura 17B).

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usan para evaluar la actividad ADCP de infliximab junto con células diana HEK293 recombinantes que expresan mTNF α y que sobreexpresan CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando dichas células efectoras y células diana que sobreexpresan mTNF α solo.

Las células efectoras que expresan la variante H-131 de CD32A descritas en el ejemplo 4 expresaron una señal de FL, rango dinámico y sensibilidad potenciados cuando se usan para evaluar la actividad ADCP de infliximab junto con células diana HEK293 recombinantes que sobreexpresan mTNF α junto con CD80, o CD86, o tanto CD80 como CD86 en relación con un ensayo de ADCP usando células efectoras que expresan Fc γ RIIA funcionalmente unido al gen indicador FL bajo el control de un promotor quimérico NFAT y células diana de mTNF α .

Bibliografía

1. Parekh, B. S., *et al.* Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity reporter gene assay. *mAbs* 4:3, 310-318, 2012.
2. Cheng, Z. J., *et al.* Development of a robust reporter-based ADCC assay with frozen, thaw-and-use cells to measure Fc effector function of therapeutic antibodies. *J. Immunol., Methods*, 414:69-81, 2014.
3. Lallemand, C. *et al.*, A Novel System for the Quantification of the ADCC Activity of Therapeutic Antibodies. *J. immunol. Res.* 1-17, 2017.
4. Lallemand *et al.* Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists. *J. Immunol. Methods*, 373:229-239, 2011.
- Tatsumi, T., *et al.*, expression of co-stimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma; *Hepatology*, 25:1108-1114, 1997.

REIVINDICACIONES

1. Célula que comprende un constructo de vector que codifica una o más moléculas coestimuladoras en donde el constructo de vector comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en SEQ ID NO.:1, y en donde el constructo de vector comprende además un polinucleótido que codifica una o más seleccionadas de la molécula coestimuladora CD28, molécula coestimuladora CD137 (4-1BB), molécula coestimuladora CD247 (cadena Zeta T3), molécula coestimuladora CD278 (ICOS), o en donde las moléculas coestimuladoras son receptores seleccionados de uno o más de CD28, CD137L (4-1BB) e ICOS.
2. Célula según la reivindicación 1, en donde la una o más moléculas coestimuladoras se expresan constitutivamente o se sobreexpresan en las células.
3. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células expresan además CD16A o CD32.
4. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde CTLA-4 (CD152) está específicamente invalidado.
5. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula es una célula primaria o una línea celular.
6. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho vector es episómico o está integrado en el genoma de dicha célula.
7. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula expresa además una primera proteína indicadora.
8. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera proteína indicadora es una enzima tal como, por ejemplo, una luciferasa o una proteína fluorescente, y en donde la célula expresa además una segunda proteína indicadora que es diferente de la primera proteína indicadora.
9. Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula expresa o sobreexpresa además un antígeno reconocido por un anticuerpo o proteína de fusión de Fc.
10. Kit, que comprende:
 - i) una célula efectora (E), capaz de unirse a la región Fc de un anticuerpo y expresar una o más moléculas coestimuladoras o sobreexpresar una o más moléculas coestimuladoras, y en donde la célula efectora (E) es según cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
 - ii) una célula diana (T-) en la que la diana/antígeno endógeno frente al que dicho anticuerpo es específico se invalida (muta) de modo que la diana/antígeno no se expresa por la célula o se expresa en una forma no funcional; y
 - iii) una célula diana (T+) en la que la expresión de la diana frente al que dicho anticuerpo es específico se potencia o se sobreexpresa junto con una o más moléculas coestimuladoras incluidas CD80, CD86, CD137L y (CD278L) ICOSL, y en donde la célula en ii) y la célula iii) son exactamente la misma célula idéntica en todos los aspectos, excepto que la célula en ii) no expresa un antígeno específico reconocido por el anticuerpo o fármaco que está sometándose a ensayo.
11. Kit según una cualquiera de la reivindicación 10, en donde la diana/antígeno es uno o más de CD20, mTNF α , erbB2, EGFR.
12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en donde el kit comprende dos viales y en donde las células en i) y iii) están presentes en un mismo vial a la razón E:T óptima, en donde la razón entre la célula efectora en i) y la célula diana en iii) (razón E:T) está en el intervalo de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 2:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 1,5:1.
13. Método para cuantificar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos terapéuticos, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) poner en contacto una muestra obtenida que contiene un anticuerpo, con la célula efectora (E) i) según la reivindicación 10 i) y células diana iii) según la reivindicación 10 iii),
 - b) restar la señal obtenida en presencia de células efectoras (E) i) y células ii) según la reivindicación 10 ii), en las que se ha invalidado la diana farmacológica, de la señal obtenida en presencia de células efectoras

- (E) i) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y células diana iii) según la reivindicación 10 iii),
- c) determinar la actividad ADCC basándose en la razón de señal medida en a) y b).
- 5 14. Método para cuantificar la actividad de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) de anticuerpos terapéuticos, comprendiendo el método las etapas de;
- 10 a) poner en contacto una muestra obtenida que contiene un anticuerpo, células efectoras (E) i) según la reivindicación 10 i) y con células diana iii) según la reivindicación 10 iii),
- b) restar la señal obtenida en presencia de células efectoras (E) i) según la reivindicación 10 i) y células ii) según la reivindicación 10 ii), en las que se ha invalidado la diana farmacológica, de la señal obtenida en presencia de células efectoras i) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y células diana iii) según la reivindicación 10 iii),
- 15 c) determinar la actividad ADCP basándose en la razón de señal medida en a) y b).
15. Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en un ensayo biológico.
- 20 16. Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en diagnóstico o un método de diagnóstico.
17. Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en un ensayo para potenciar el rango dinámico y/o aumentar la sensibilidad en el ensayo, en donde las células se usan para evaluar la actividad ADCC y/o ADCP de un anticuerpo.
- 25

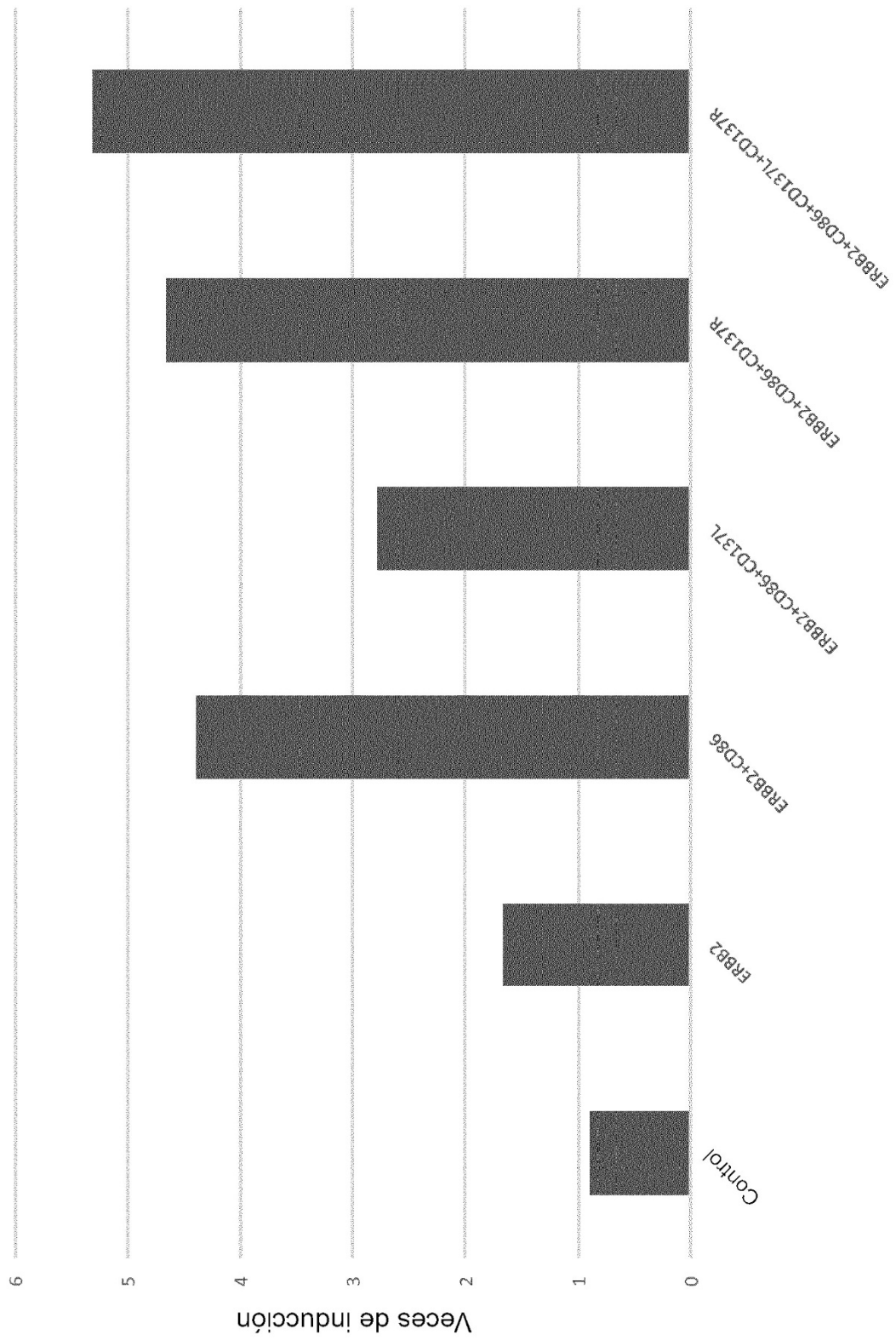


Fig. 1A

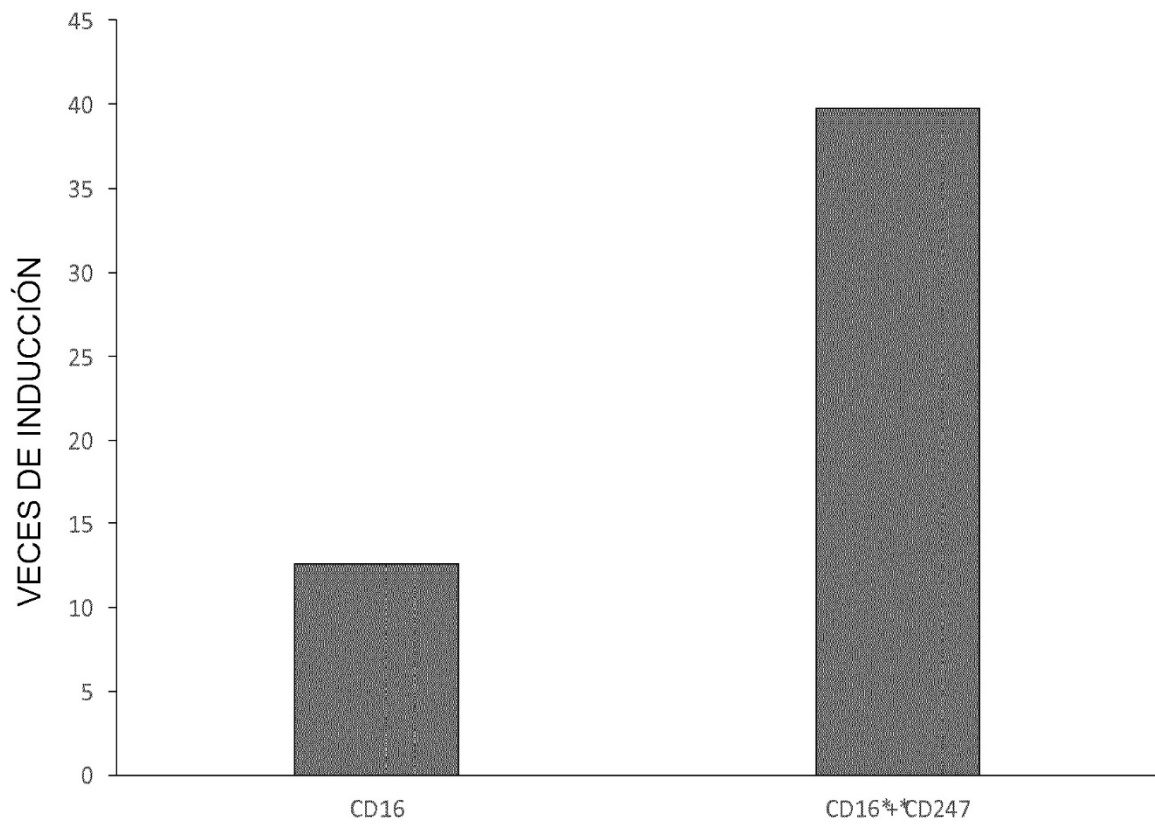
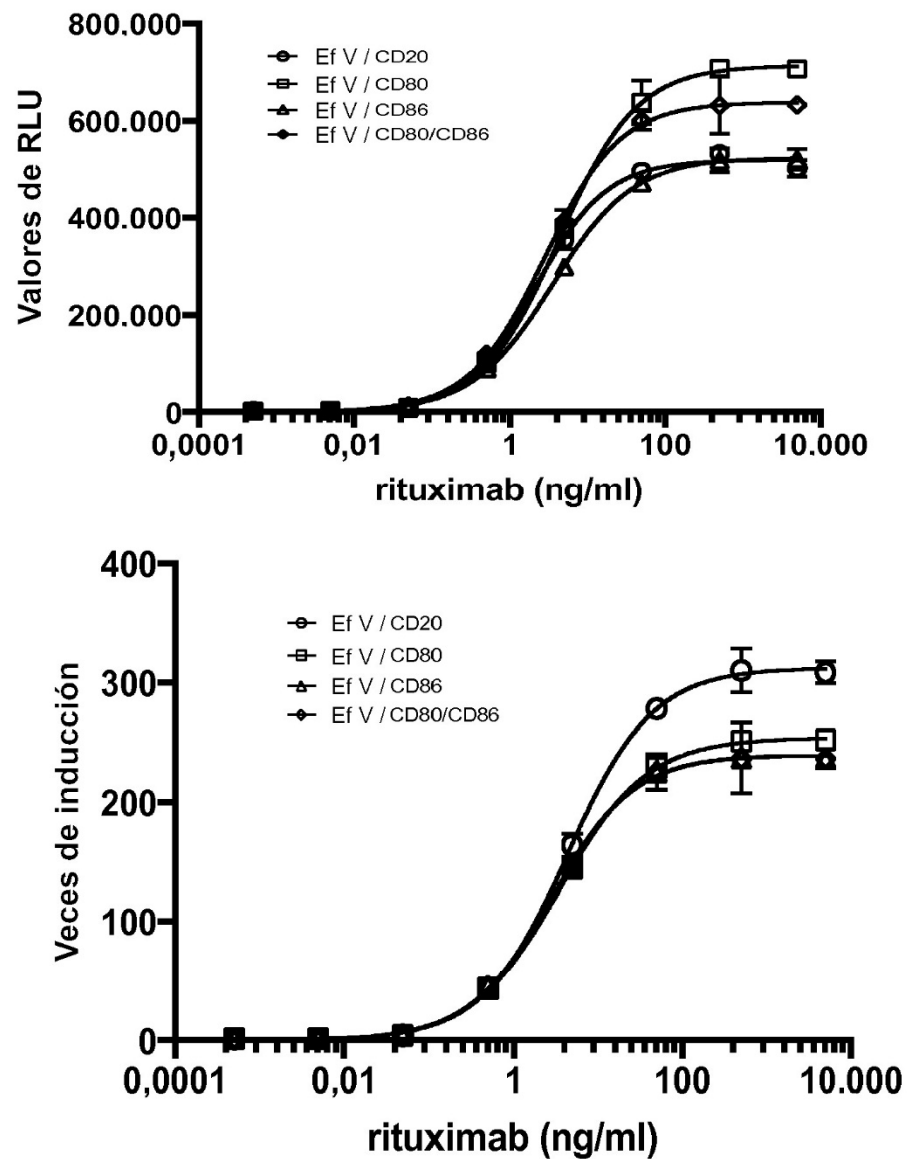
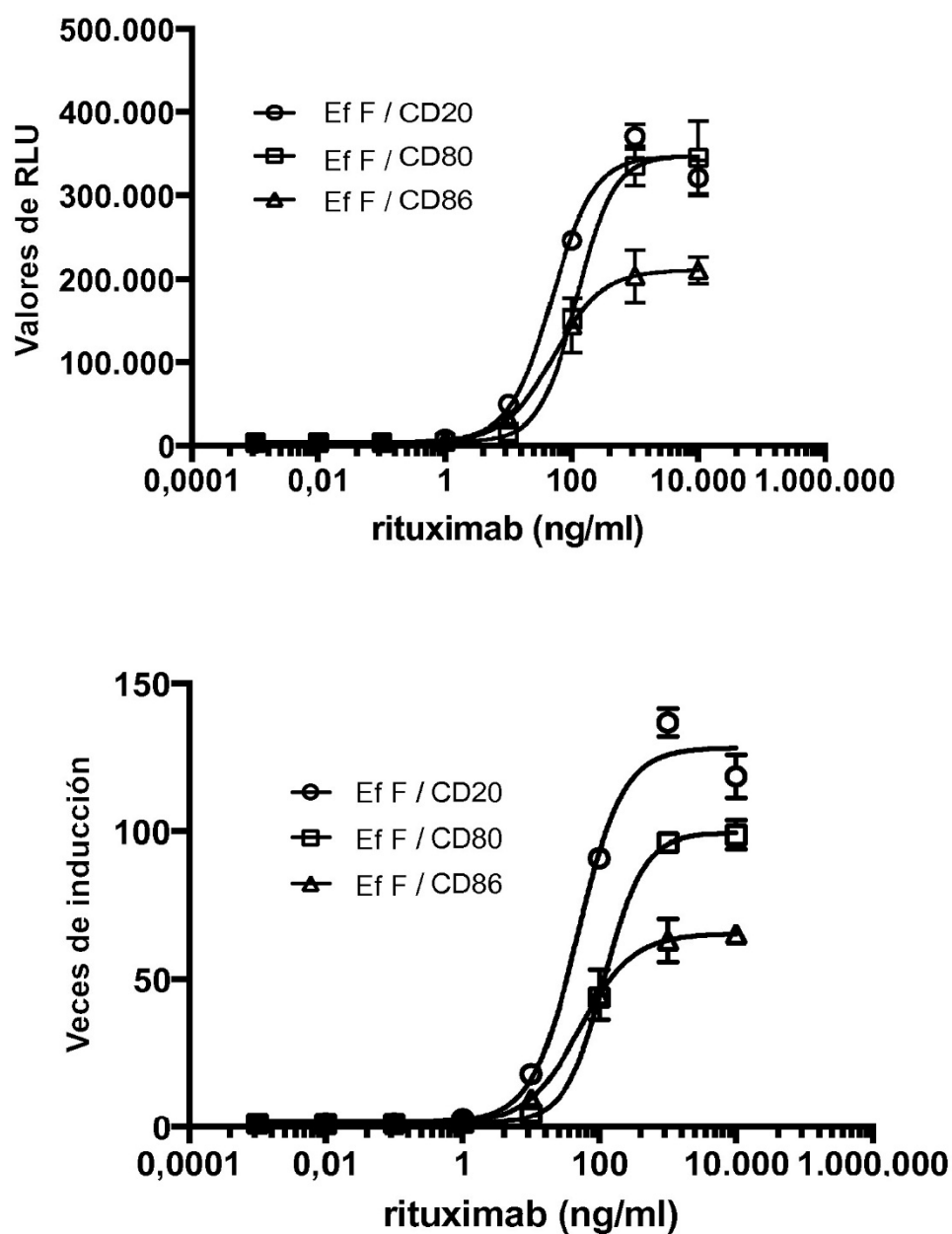


Fig. 1B



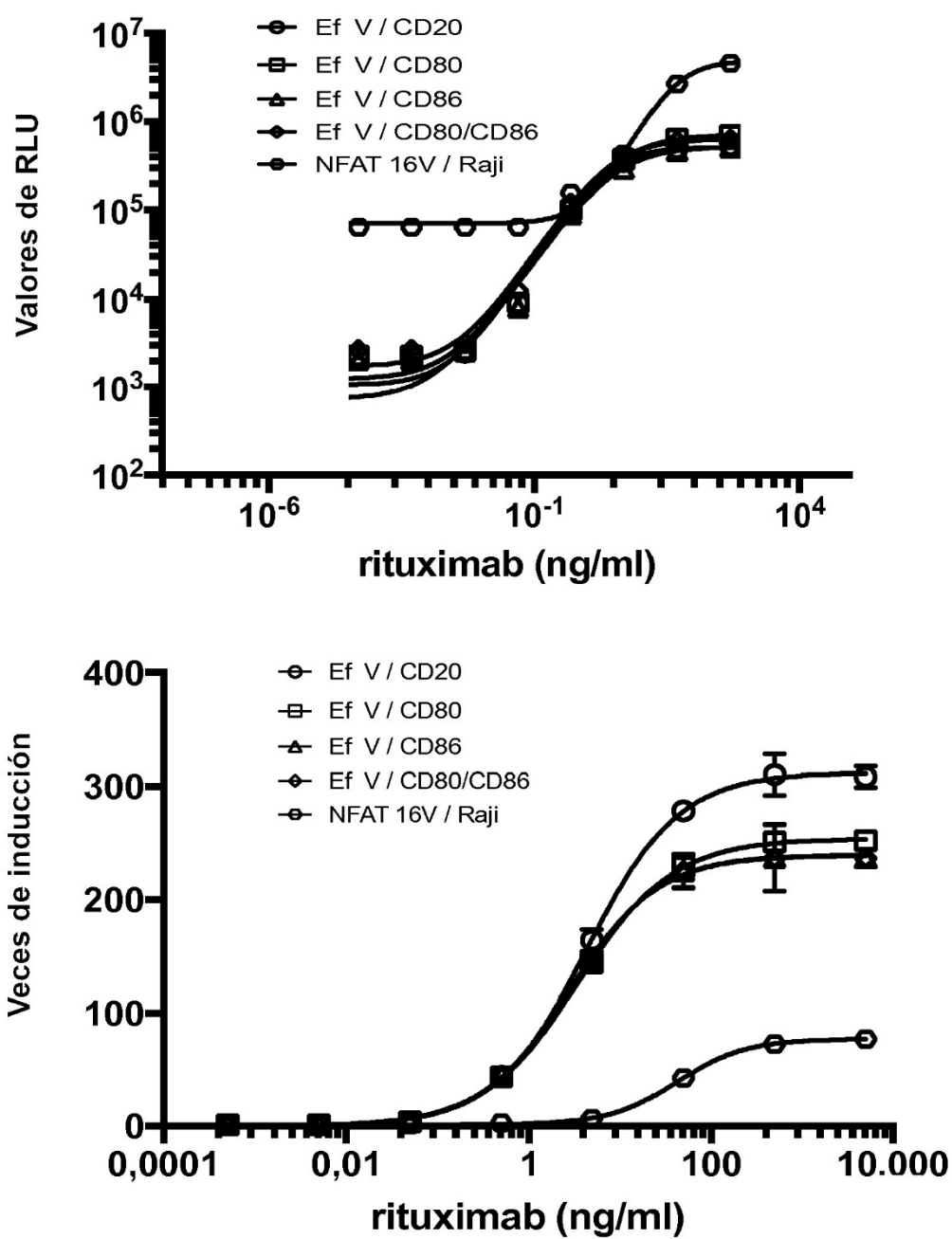
	Ef V / CD20	Ef V / CD80	Ef V / CD86	Ef V / CD80/CD86
Asíntota superior	519549	713632	524127	638074
Asíntota inferior	2235	2290	2065	2670
Pendiente de Hill	0,933	0,864	0,8285	0,887
CE50 (ng/ml)	2,143	4,326	3,502	2,815
Veces de inducción	312,2	253,9	239,7	239,3

Fig. 2A



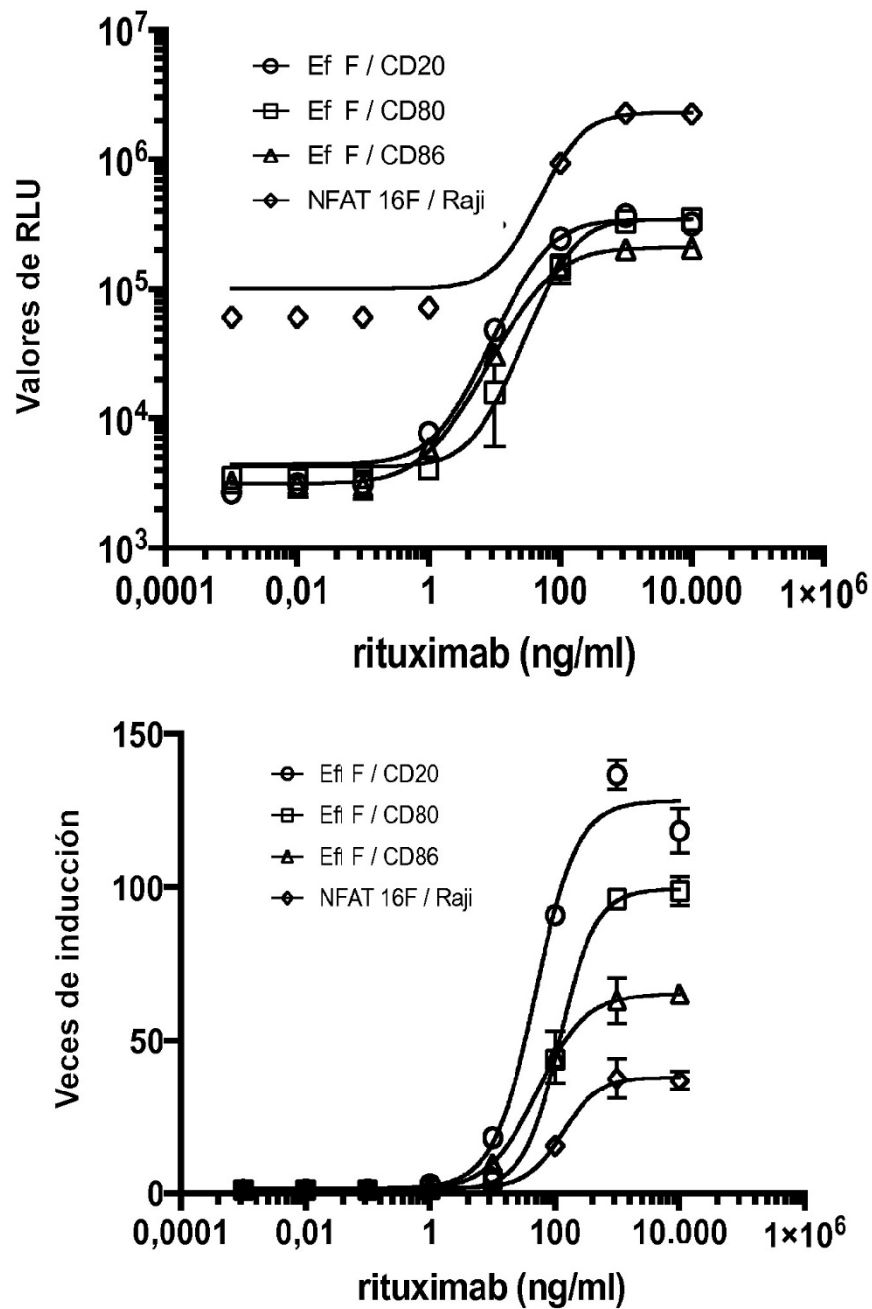
	Ef F / CD20	Ef F / CD80	Ef F / CD86
Asíntota superior	347363	347263	210818
Asíntota inferior	4428	4272	3124
Pendiente de Hill	1,297	1,475	1,127
CE50 (ng/ml)	48,13	119,5	51,18
Veces de inducción	128,2	99,45	65,4

Fig. 2B



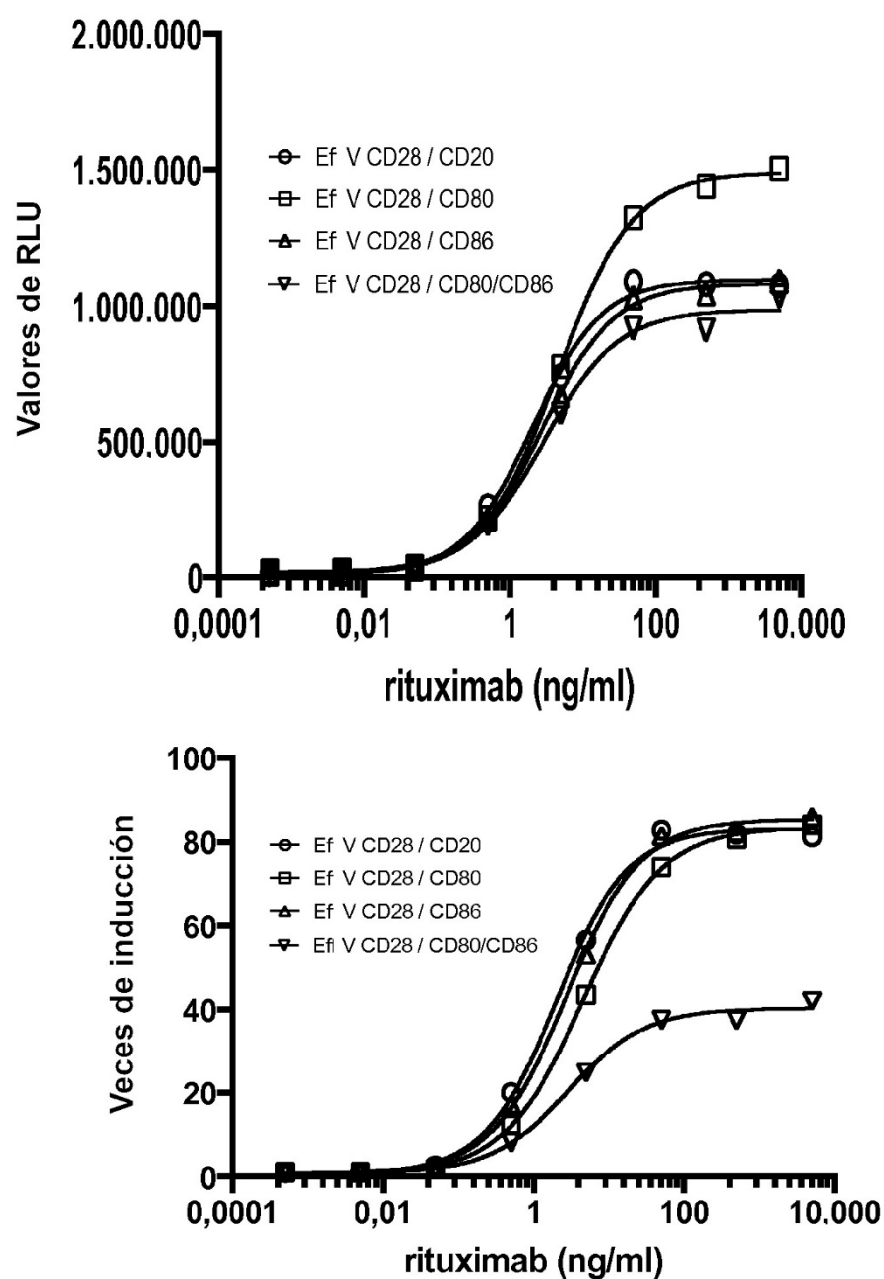
	Ef V / CD20	Ef V / CD80	Ef V / CD86	Ef V / CD80/CD86	NFAT 16V / Raji
Asíntota superior	519549	713632	524127	638074	4912678
Asíntota inferior	2235	2290	2065	2670	76551
Pendiente de Hill	0,933	0,864	0,8285	0,887	1,157
CE50 (ng/ml)	2,143	4,326	3,502	2,815	43,15
Veces de inducción	232,9	312,2	253,9	239,7	76,85

Fig. 3A



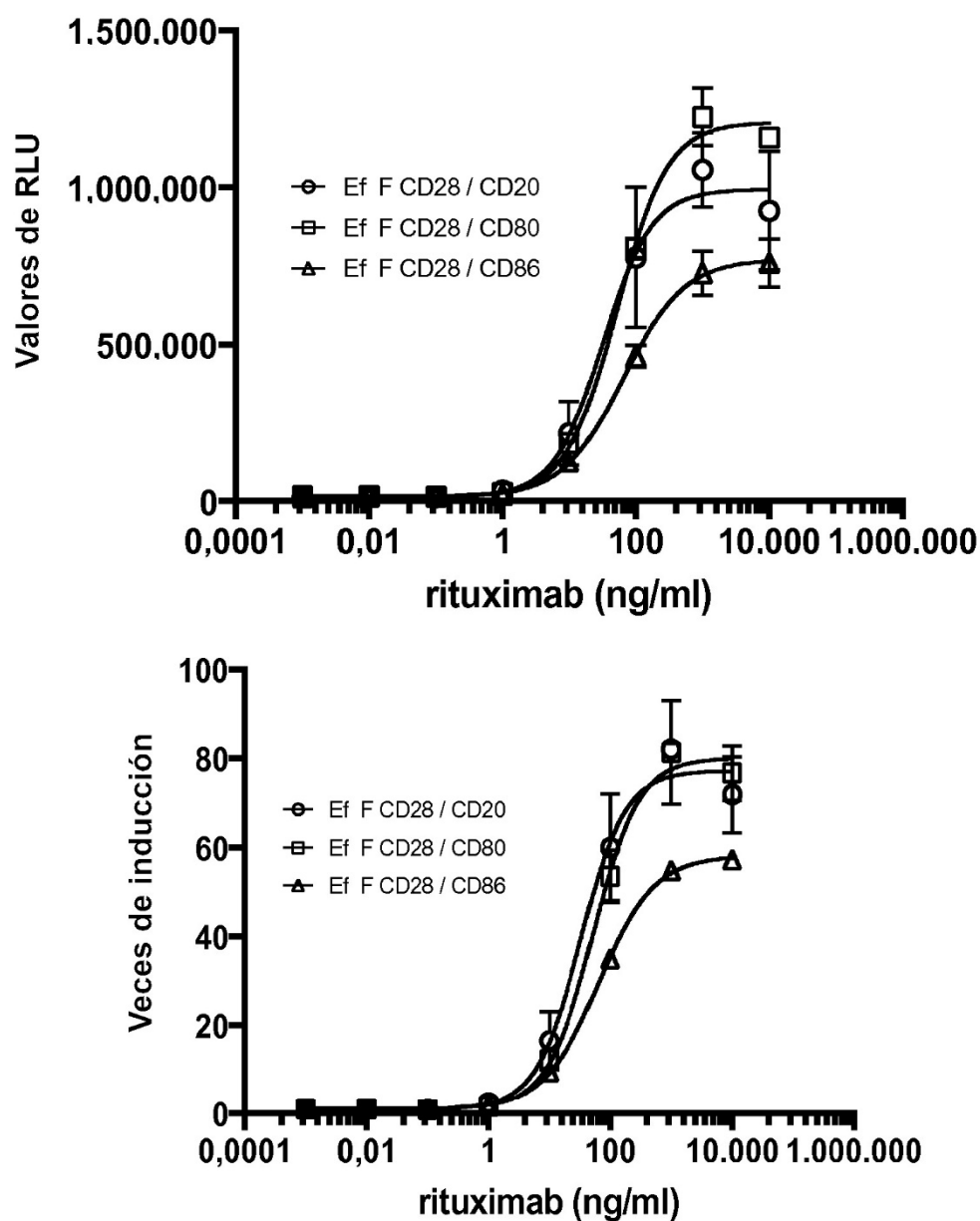
	Ef F / CD20	Ef F / CD80	Ef F / CD86	NFAT 16F / Raji
Asíntota superior	347363	347263	210818	2319387
Asíntota inferior	4428	4272	3124	101304
Pendiente de Hill	1,297	1,475	1,127	1,49
CE50 (ng/ml)	48,13	119,5	51,18	134,7
Veces de inducción	128,2	99,45	65,4	38,03

Fig. 3B



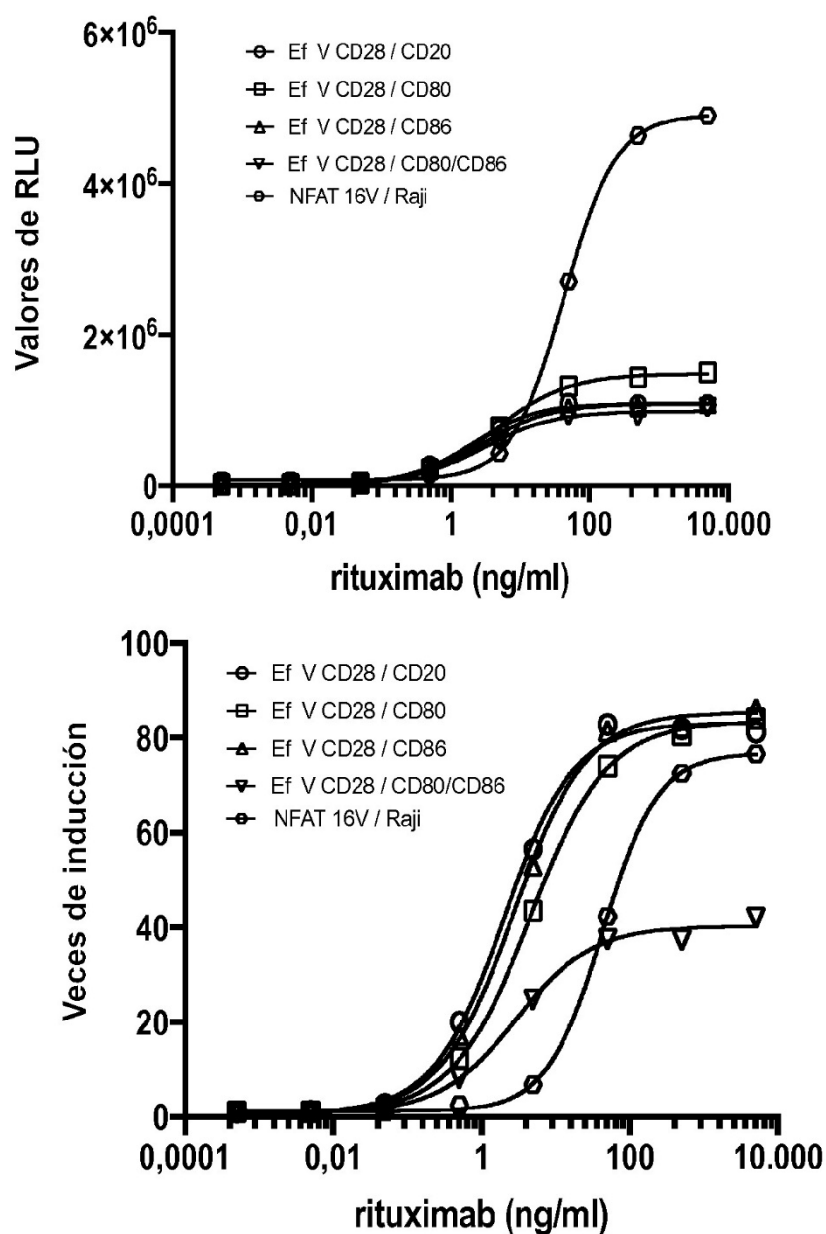
	Ef V/CD28/CD20	Ef V/CD28/CD80	Ef V/CD28/CD86	Ef V/CD28/CD80/CD86
Asíntota superior	1098073	1492550	1082758	987610
Asíntota inferior	10220	11814	10290	18979
Pendiente de Hill	0,9121	0,8319	0,8783	0,8462
CE50 (ng/ml)	2,034	4,518	2,771	2,951
Veces de inducción	83,15	83,45	85,38	40,34

Fig. 4A



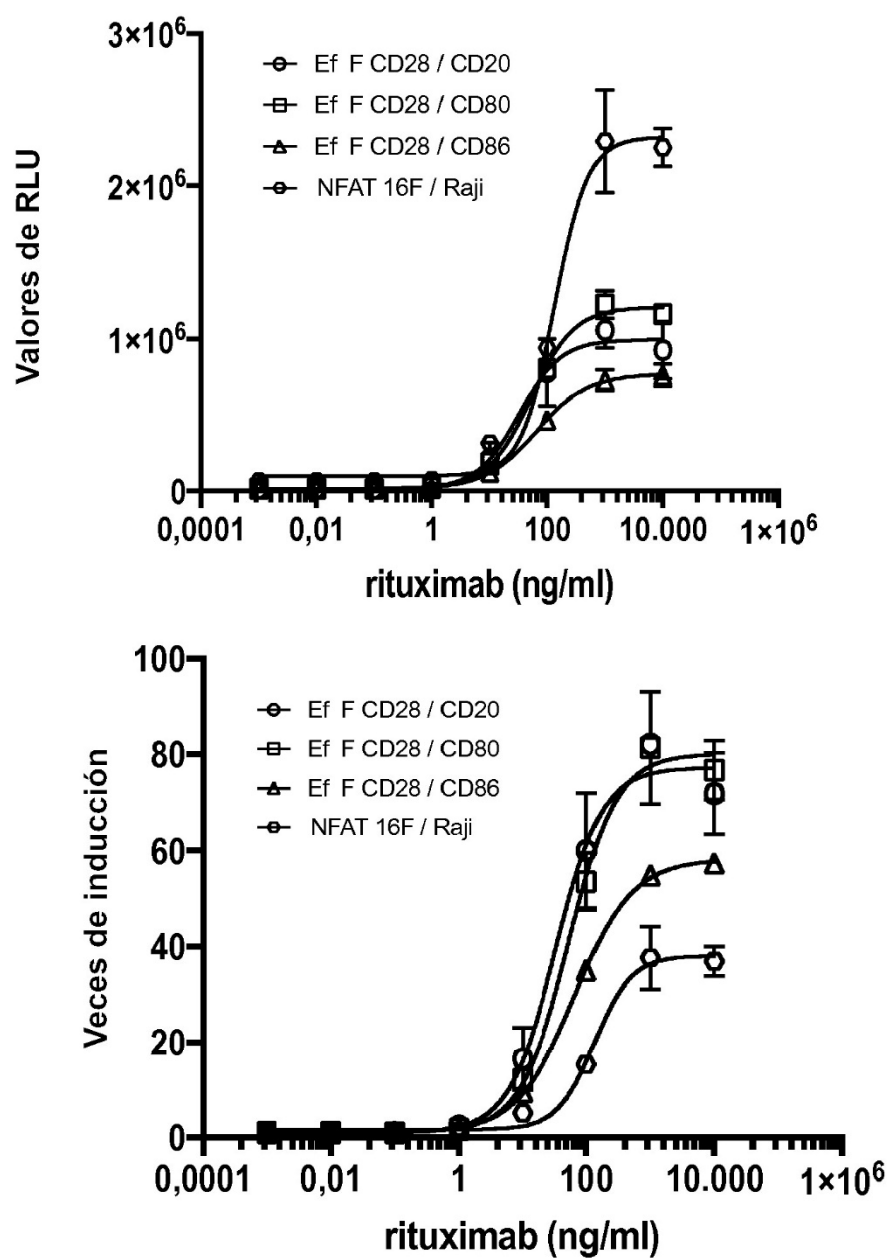
	Ef F CD28 / CD20	Ef F CD28 / CD80	Ef F CD28 / CD86
Asíntota superior	994690	1208742	772854
Asíntota inferior	14614	16704	12532
Pendiente de Hill	1,188	1,145	0,9518
CE50 (ng/ml)	32,25	52,7	65,37
Veces de inducción	77,21	80,07	58,2

Fig. 4B



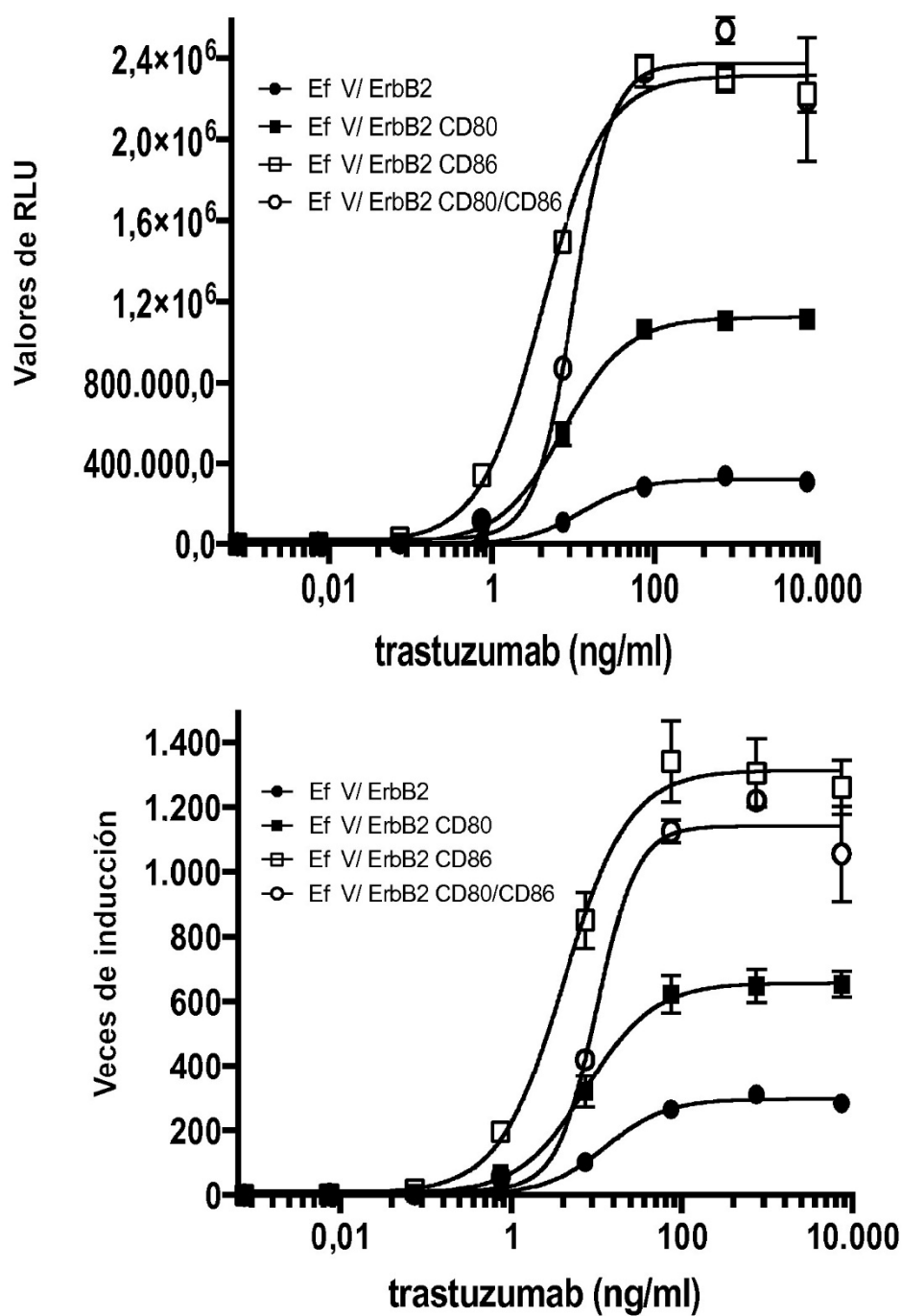
	Ef V CD28 / CD20	Ef V CD28 / CD80	Ef V CD28 / CD86	Ef V CD28 / CD80/CD86	NFAT 16V / Raji
Asíntota superior	1098073	1492550	1082758	987610	4912678
Asíntota inferior	10220	11814	10290	18979	76551
Pendiente de Hill	0,9121	0,8319	0,8783	0,8462	1,157
CE50 (ng/ml)	2,034	4,518	2,771	2,951	43,15
Veces de inducción	83,15	83,45	85,38	40,34	76,85

Fig. 5A



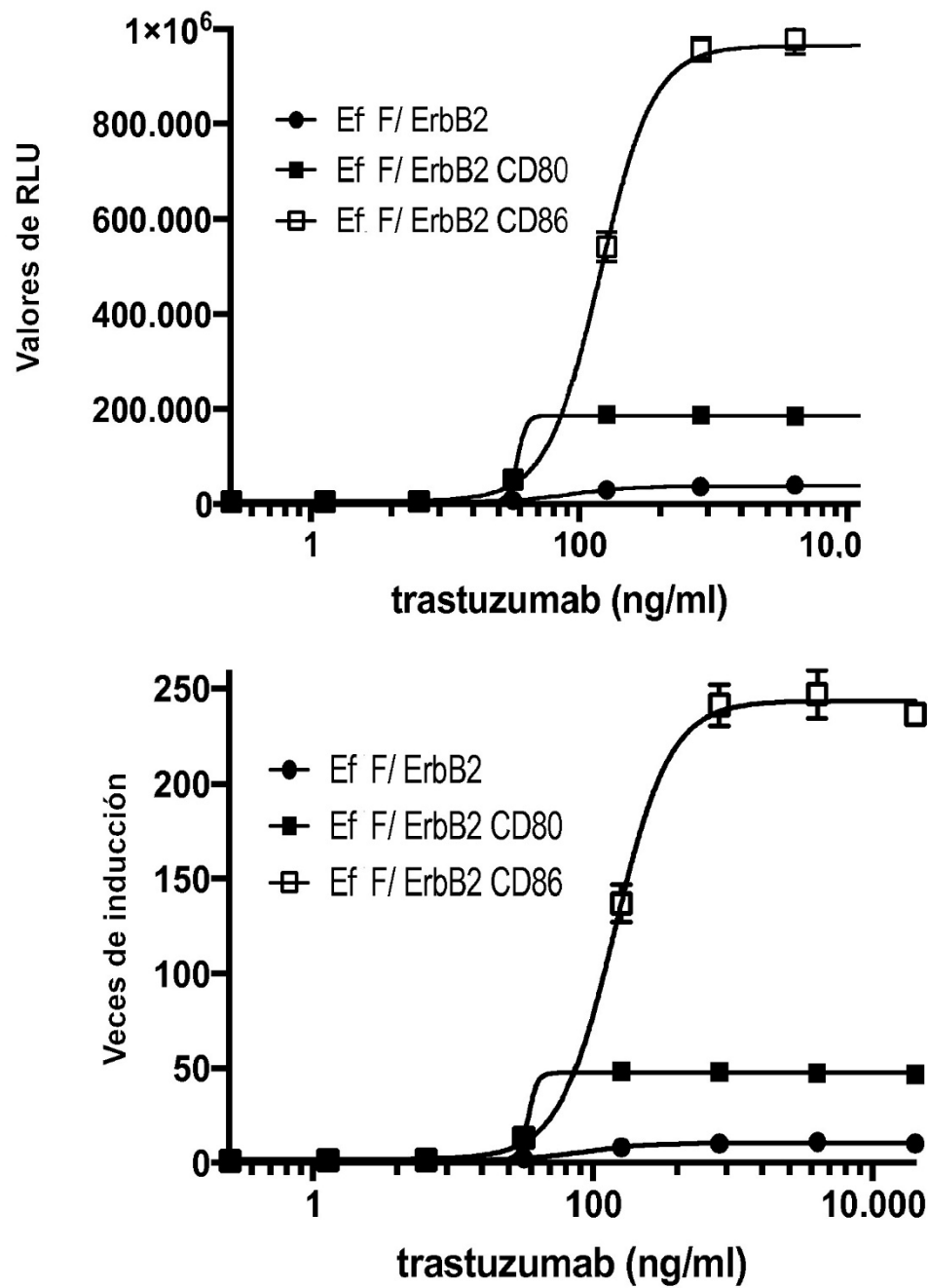
	Ef F CD28 / CD20	Ef F CD28 / CD80	Ef F CD28 / CD86	NFAT 16F / Raji
Asíntota superior	994690	1208742	772854	2319387
Asíntota inferior	14614	16704	12532	101304
Pendiente de Hill	1,188	1,145	0,9518	1,49
CE50 (ng/ml)	32,25	52,7	65,37	134,7
Veces de inducción	77,21	80,07	58,2	38,03

Fig. 5B



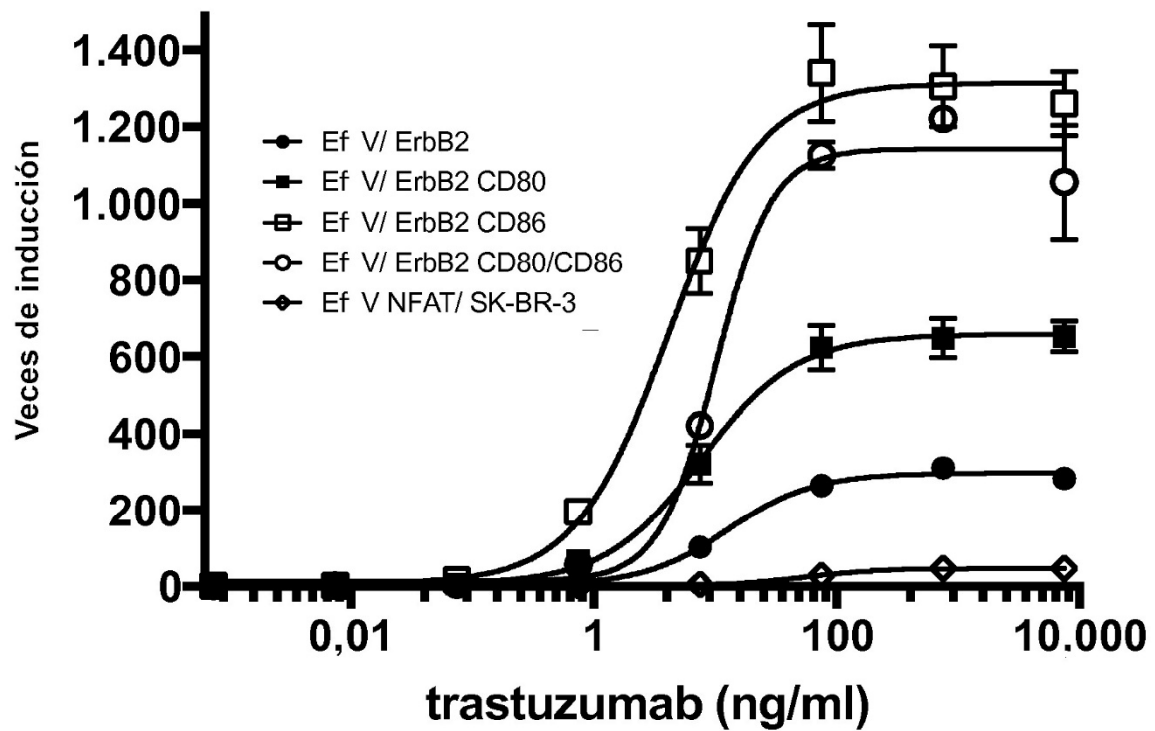
	Ef V/ ErbB2	Ef V/ ErbB2 CD80	Ef V/ ErbB2 CD86	Ef V/ ErbB2 CD80/CD86
Asíntota superior	324.042	1.123.325	2.313.547	2.374.164
Asíntota inferior	1.418	1.739	1.741	2.064
Pendiente de Hill	1,219	1,1	1,131	1,841
CE50	12,97	7,667	4,151	10,21
Veces de inducción	297	658	1,314	1,142

Fig. 6A



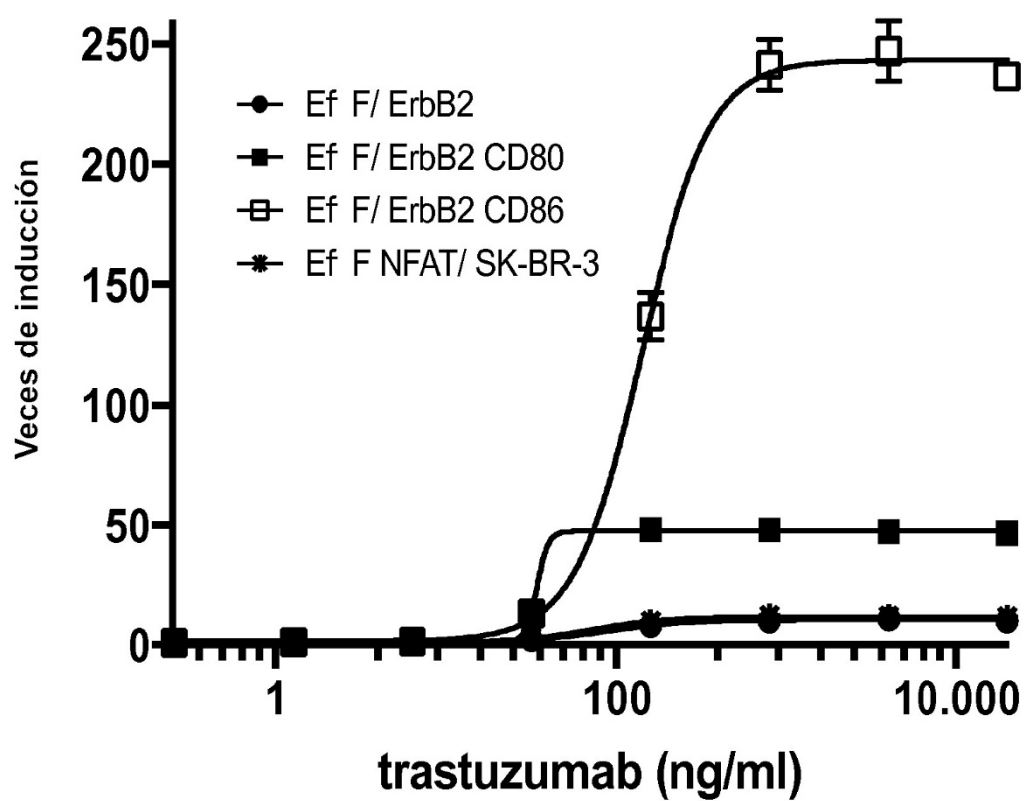
	Ef F/ ErbB2	Ef F/ ErbB2 CD80	Ef F/ ErbB2 CD86
Asíntota superior	38.371	186.250	964.242
Asíntota inferior	3.689	3.908	3.952
Pendiente de Hill	1,851	13,15	2,189
CE50	88	34	142
Veces de inducción	10	47	243

Fig. 6B



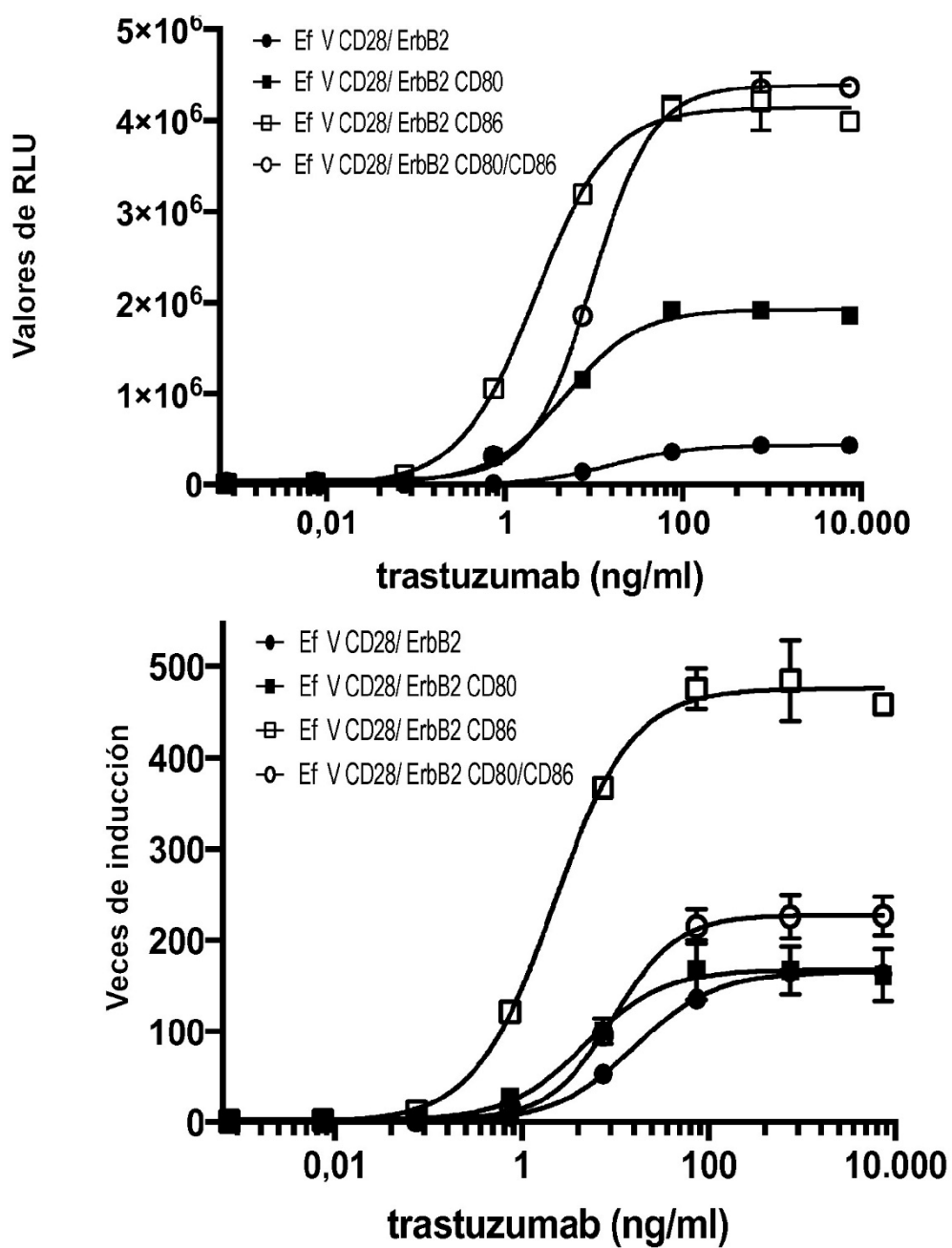
	Ef #/ErbB2	Ef #/ErbB2#CD80	Ef #/ErbB2#CD86	Ef V/ErbB2#CD80/CD86	Ef V#NFAT/#SKBr3
Asíntota superior	324.042	1.123.325	2.313.547	2.374.164	1.542.574
Asíntota inferior	1.418	1.739	1.741	2.064	35.614
Pendiente de Hill	1,219	1,1	1,131	1,841	1,426
CE50	12,97	7,667	4,151	10,21	56,09
Veces de inducción	297	658	1,314	1,142	46

Fig. 7A



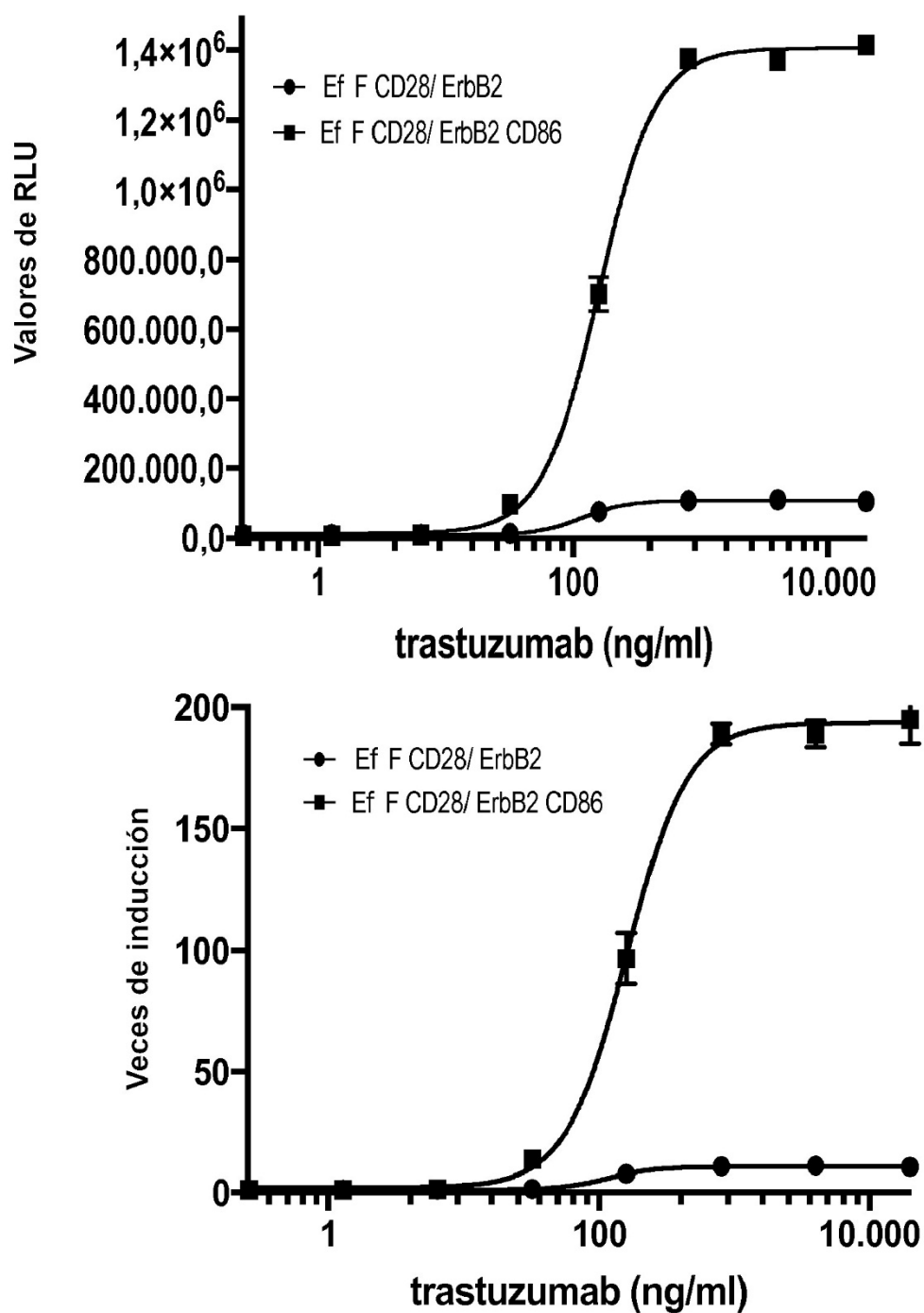
	Ef F/NFAT/SK-BR-3	Ef F/ErbB2	Ef F/ ErbB2#CD80	Ef F/ErbB2#CD86
Asíntota superior	333.935	38.371	186.250	964.242
Asíntota inferior	29.306	3.689	3.908	3.952
Pendiente de Hill	1,951	1,851	13,15	2,189
CE50	72	88	34	142
Veces de inducción	11	10	47	243

Fig. 7B



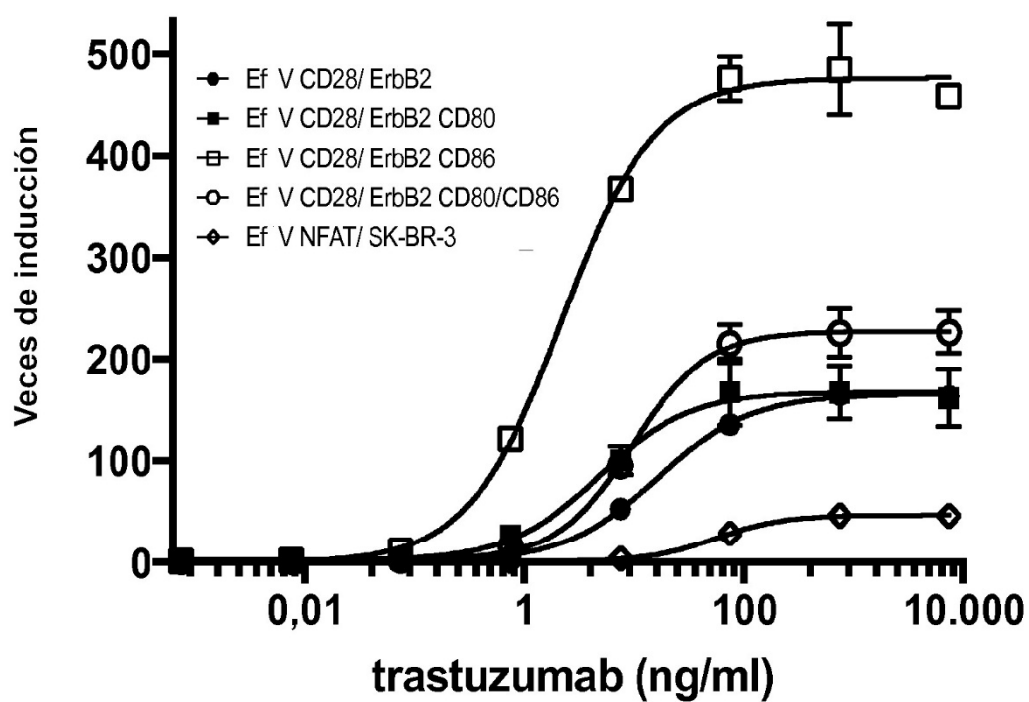
	Ef #/CD28/#ErbB2	Ef #/CD28/#ErbB2#CD80	Ef #/CD28/#ErbB2#CD86	Ef #/CD28/#ErbB2#CD80/CD86
Asíntota superior	435.831	1.927.158	4.137.595	4.381.741
Asíntota inferior	2.259	12.938	8.444	18.012
Pendiente de Hill	1,009	1,048	1,027	1,271
CE50	16,45	4,74	2,191	9,578
Veces de inducción	166	168	476	228

Fig. 8A



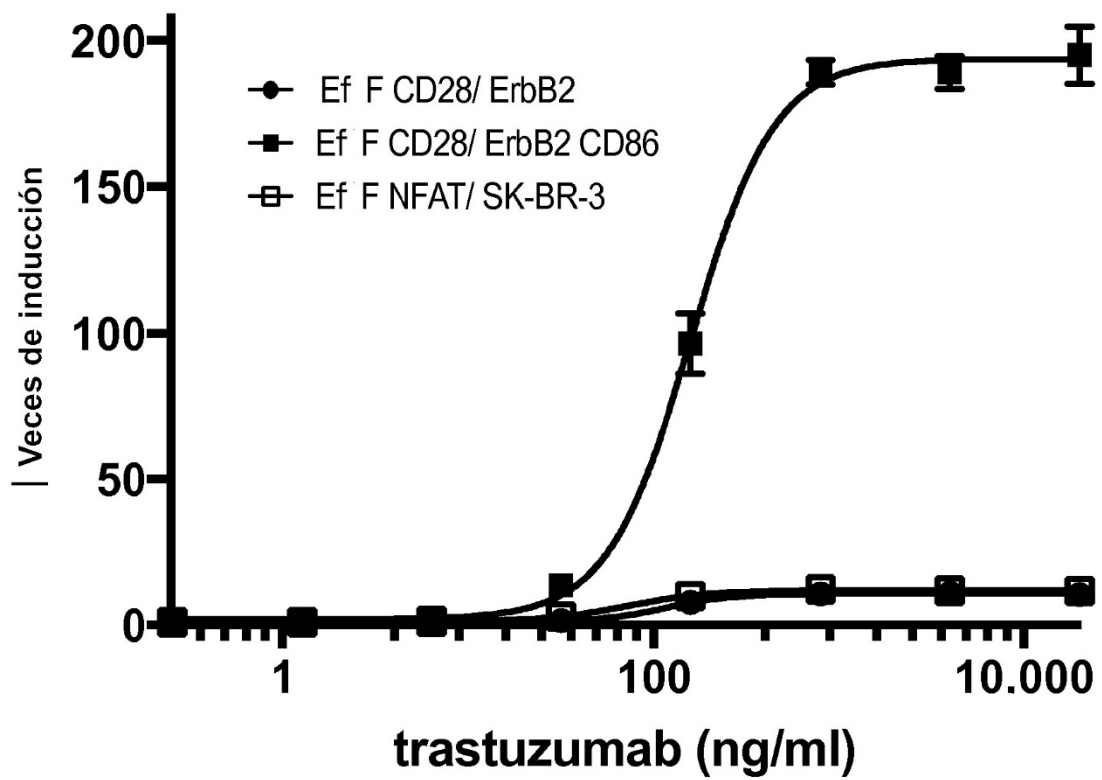
	Ef F#CD28/#ErbB2#	Ef F#CD28/#ErbB2#CD86
Asíntota superior	108.290	1.405.665
Asíntota inferior	10.550	7.563
Pendiente de Hill	2,462	1,922
CE50	117,9	160,3
Veces de inducción	10	193

Fig. 8B



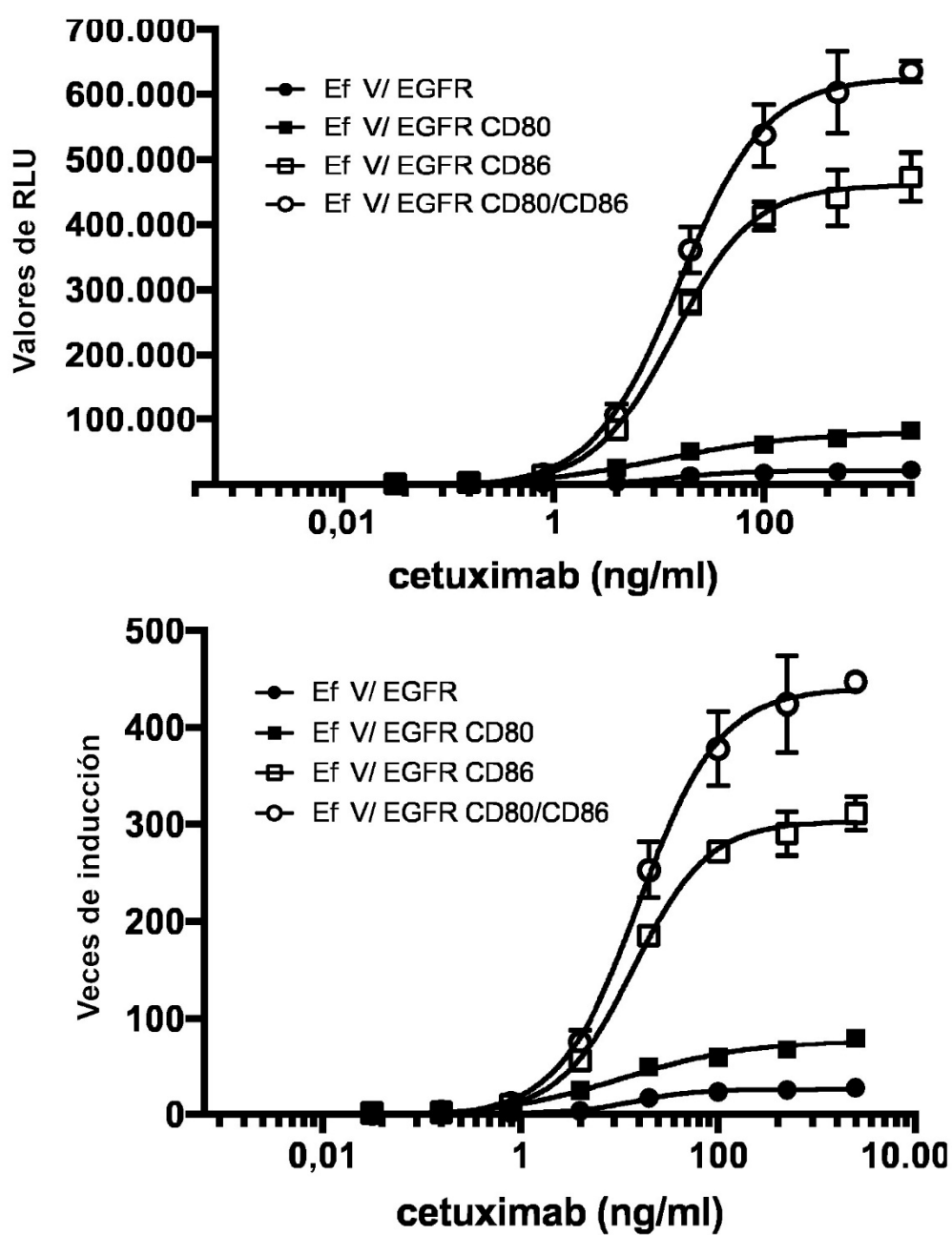
	Ef V#CD28/# ErbB2	Ef V#CD28/#ErbB2# CD80	Ef V#CD28/#ErbB2# CD86	Ef V#CD28/#ErbB2# CD80/CD86	Ef V#NFAT/#SKBr3
Asíntota superior	435.831	1.927.158	4.137.595	4.381.741	1.542.574
Asíntota inferior	2.259	12.938	8.444	18.012	35.614
Pendiente de Hill	1,009	1,048	1,027	1,271	1,426
CE50	16,45	4,74	2,191	9,578	56,09
Veces de inducción	166	168	476	228	46

Fig. 9A



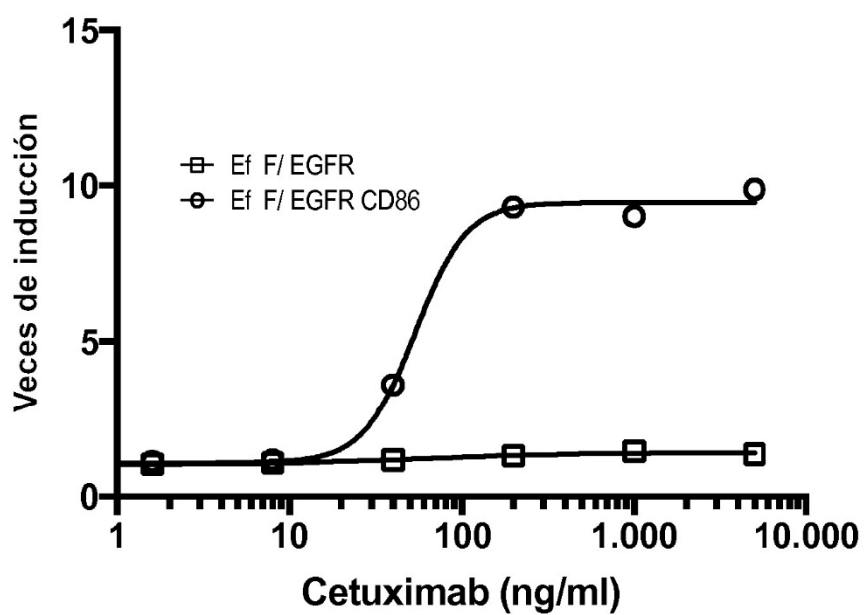
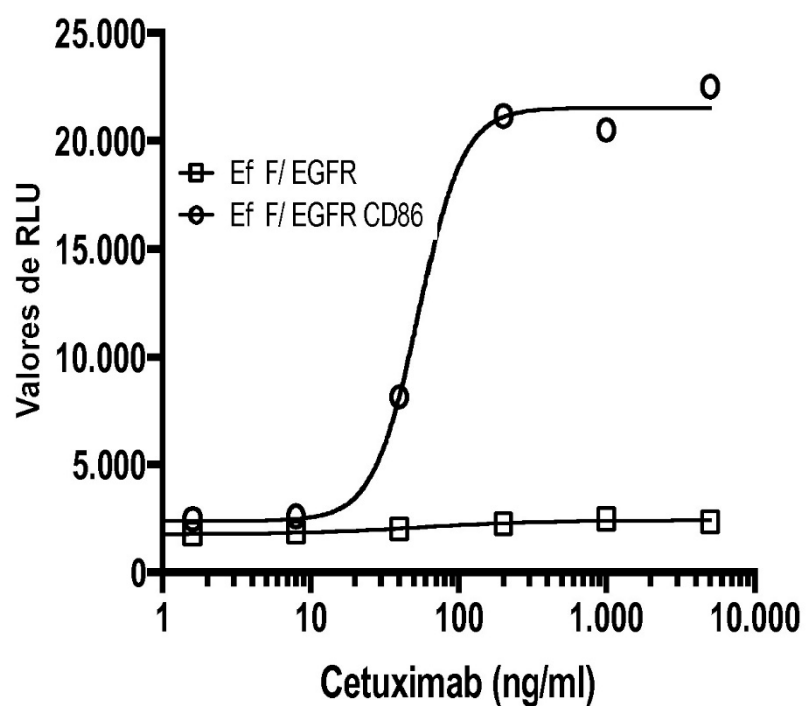
	Ef F#CD28/#ErbB2#	Ef F#CD28/#ErbB2#CD86	Ef F#NFAT/#SK-BR-3
Asíntota superior	108.290	1.405.665	333.935
Asíntota inferior	10.550	7.563	29.306
Pendiente de Hill	2,462	1,922	1,951
CE50	117,9	160,3	72,9
Veces de inducción	10	193	11

Fig. 9B



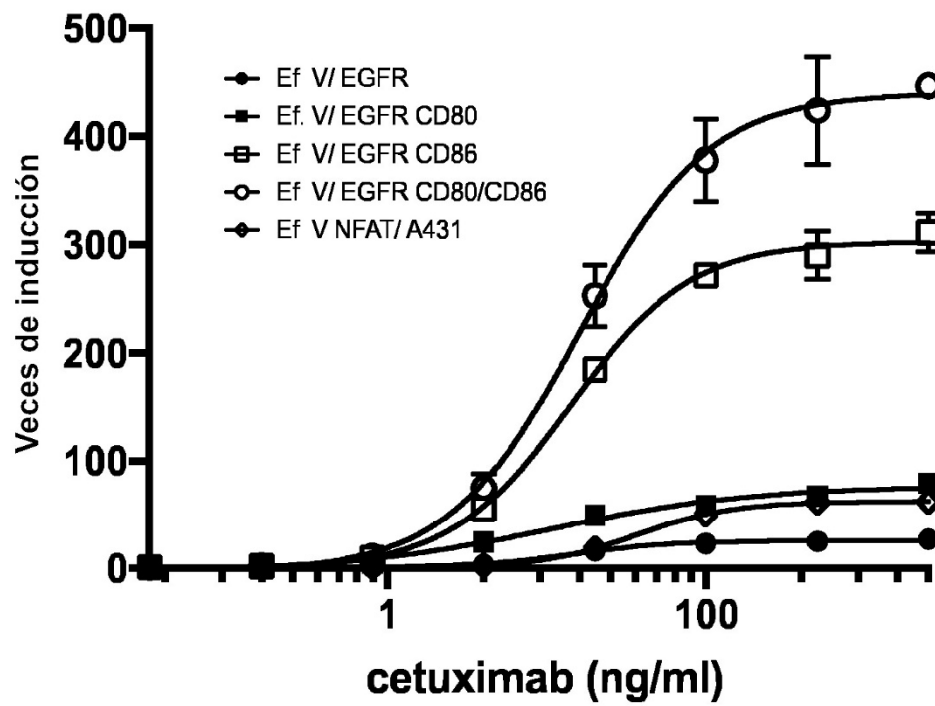
	Ef V/ EGFR	Ef V/ EGFR CD80	Ef V/ EGFR CD86	Ef V/ EGFR CD80/CD86
Asíntota superior	26.648	250.063	514.312	847.023
Asíntota inferior	1.007	2.238	2.154	1.982
Pendiente de Hill	1,547	1,34	1,258	1,68
CE50	21,6	9,914	18,26	26,74
Veces de inducción	27	109	256	485

Fig. 10A



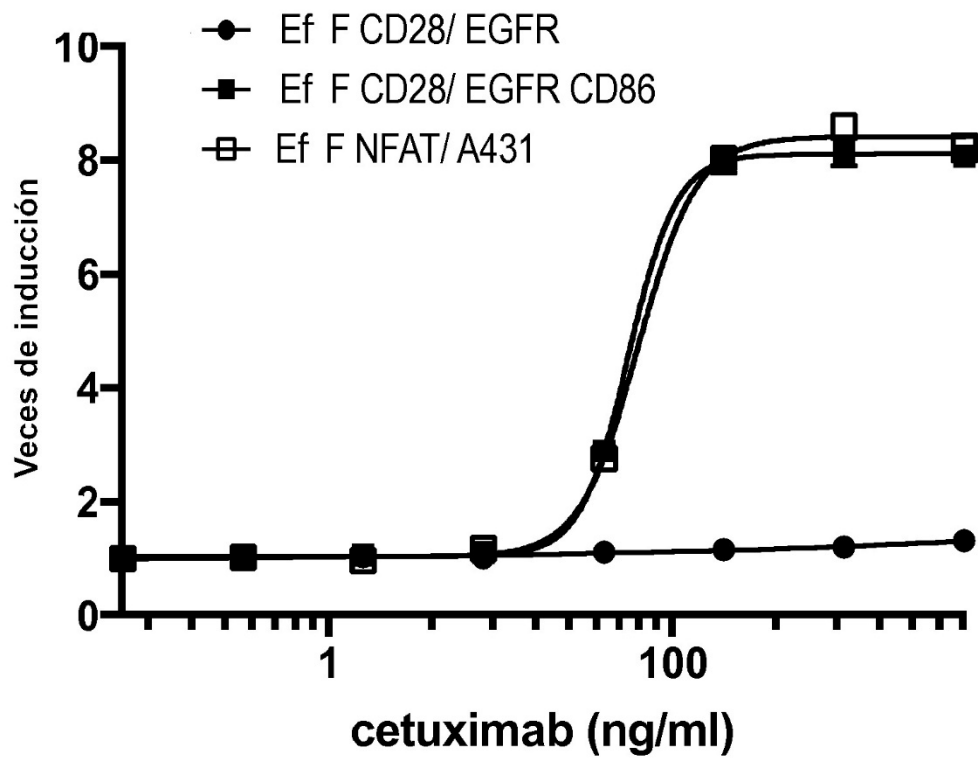
	Ef F / EGFR	Ef F / EGFR CD86
Asíntota superior	2473	21524
Asíntota inferior	1794	2438
Pendiente de Hill	0,9866	2,885
CE50 (ng/ml)	56,52	53,62
Veces de inducción	1,393	9,45

Fig. 10B



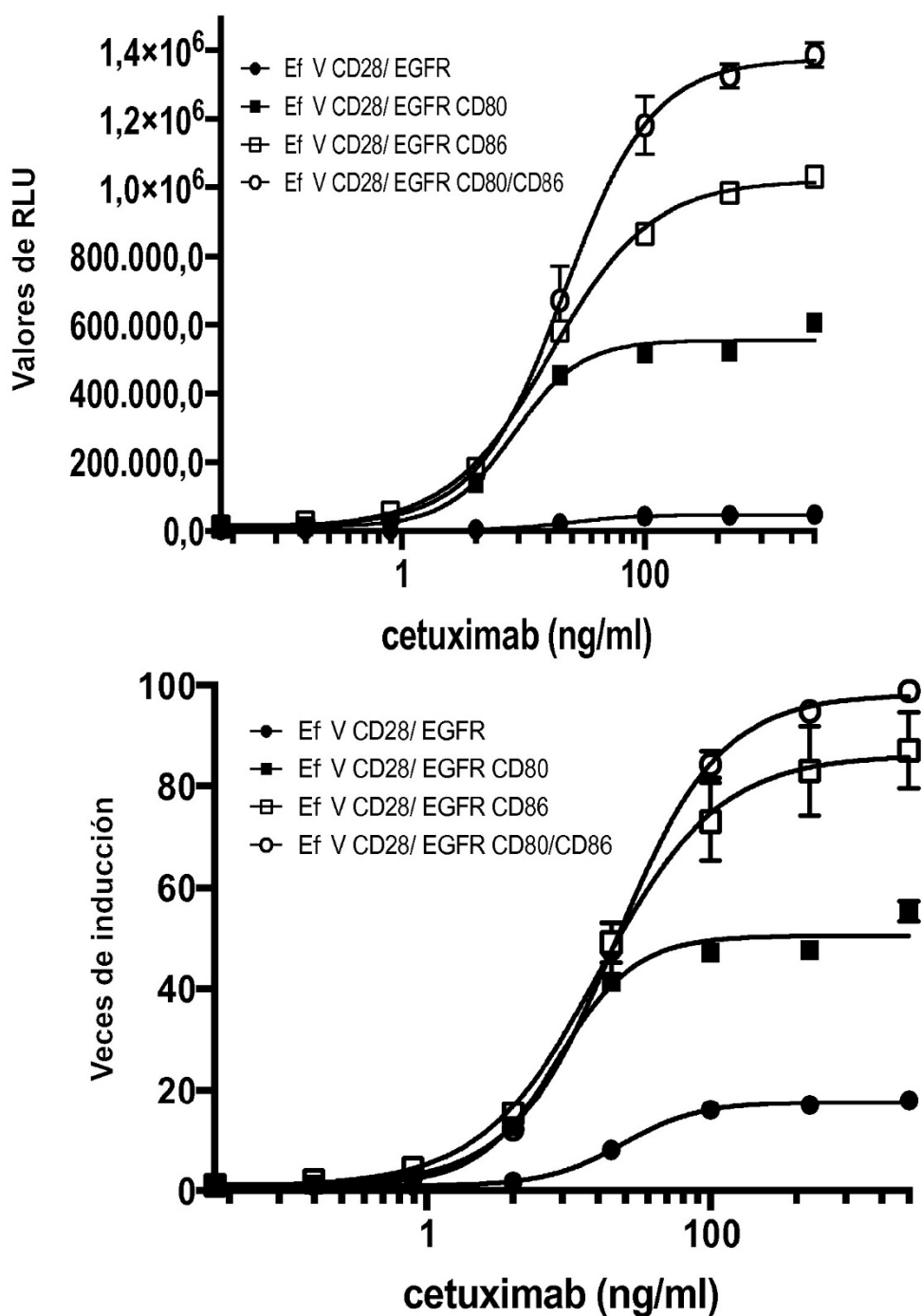
	Ef V/ EGFR	Ef V/ EGFR CD80	Ef V/ EGFR CD86	Ef V/ EGFR CD80/CD86	Ef V NFAT/ A431
Asíntota superior	26.648	250.063	514.312	847.023	2.139.934
Asíntota inferior	1.007	2.238	2.154	1.982	30.242
Pendiente de Hill	1,547	1,34	1,258	1,68	1,46
CE50	21,6	9,914	18,26	26,74	37,09
Veces de inducción	27	109	256	485	63

Fig. 11A



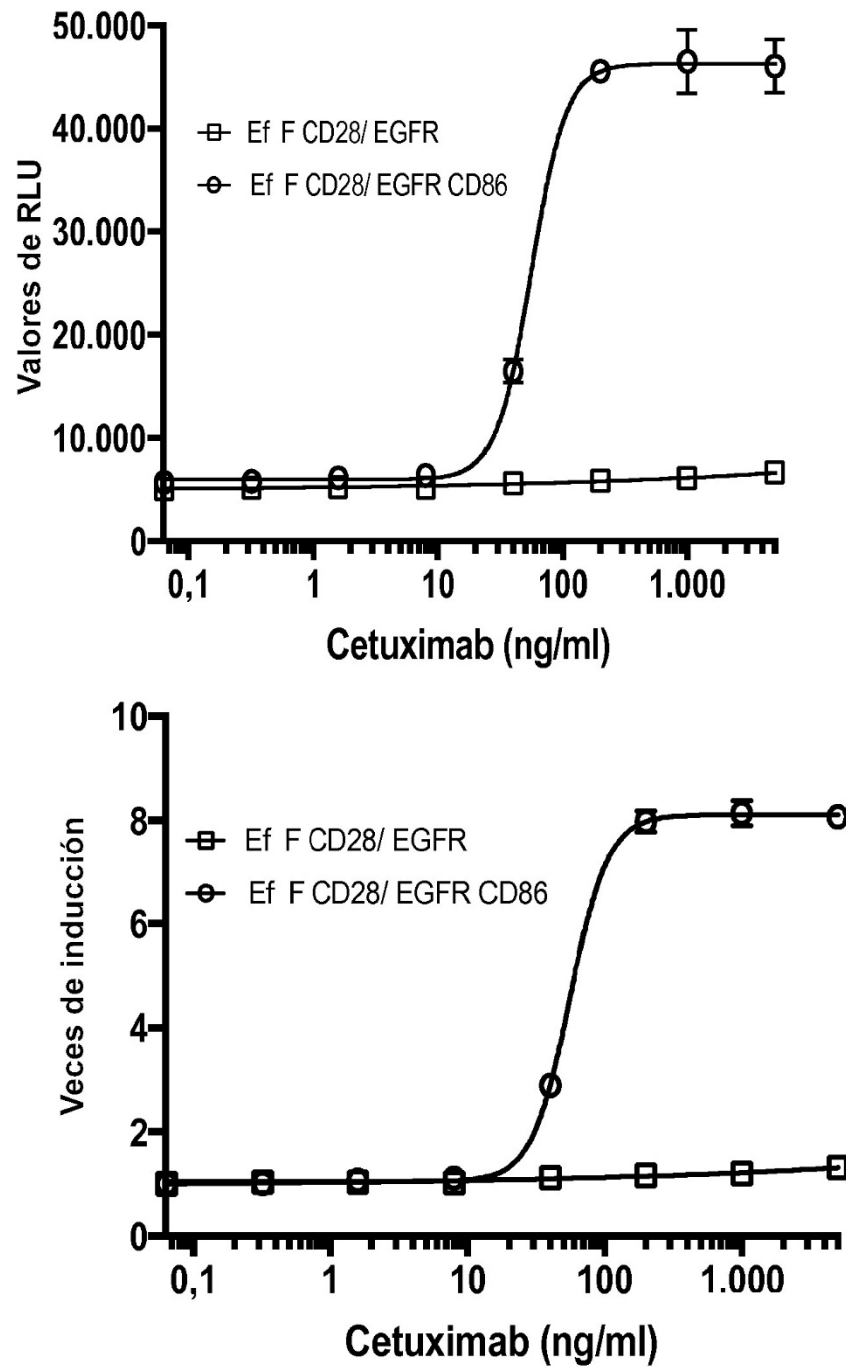
	Ef F CD28/ EGFR	Ef F CD28/ EGFR CD86	Ef F NFAT/ A431
Asíntota superior	7.644	46.294	186.111
Asíntota inferior	5.550	5.563	22.934
Pendiente de Hill	0,2109	3,085	2,522
CE50		56	63,89
Veces de inducción	1	8	8

Fig. 11B



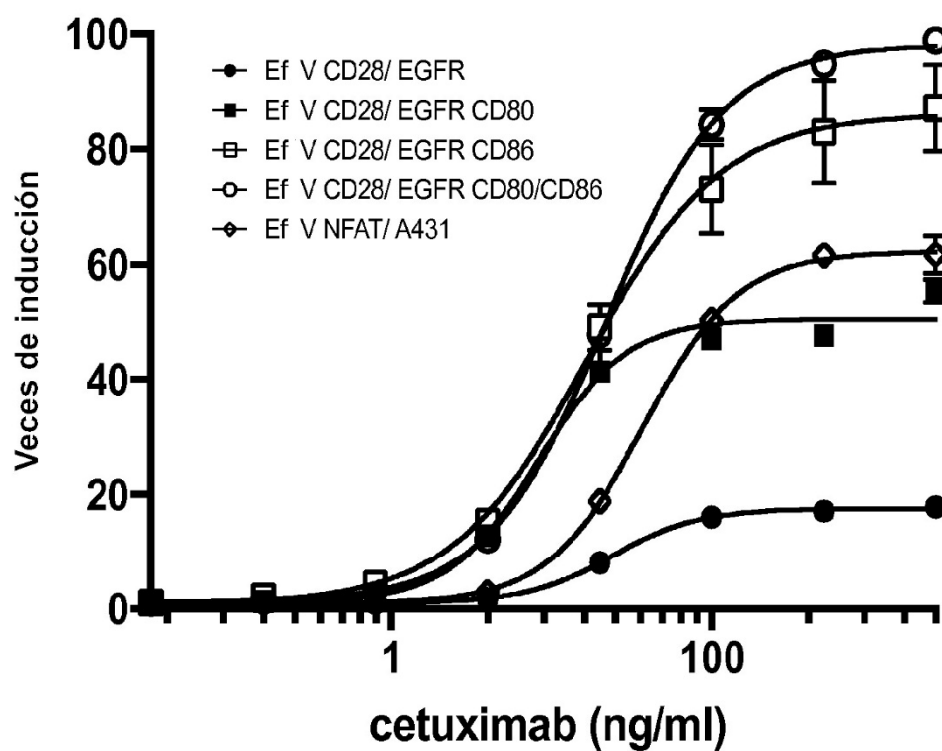
	Ef V CD28/ EGFR	Ef V CD28/ EGFR CD80	Ef V CD28/ EGFR CD86	Ef V CD28/ EGFR CD80/CD86
Asíntota superior	46.735	555.768	1.020.128	1.373.801
Asíntota inferior	2523	11.696	10.112	16.454
Pendiente de Hill	1,598	1,561	1,036	1,179
CE50	24,15	8,249	16,58	21,57
Veces de inducción	17	50	86	86

Fig. 12A



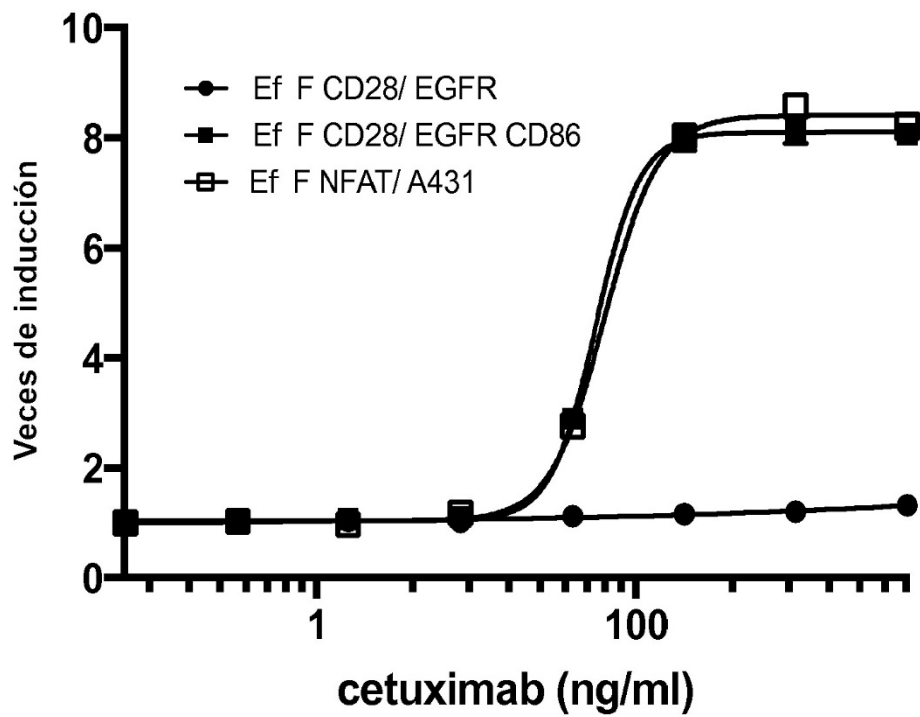
	Ef F CD28 / EGFR	Ef F CD28 / EGFR CD86
Asíntota superior	1932644	46294
Asíntota inferior	4890	5959
Pendiente de Hill	0,2109	3,085
CE50 (ng/ml)	1,399E+18	56
Veces de inducción	1,39	8,109

Fig. 12B



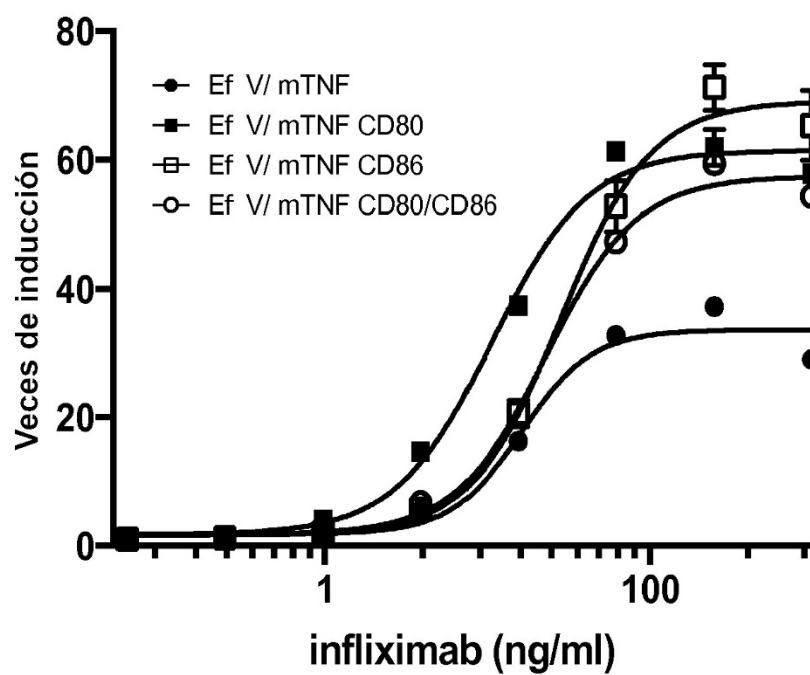
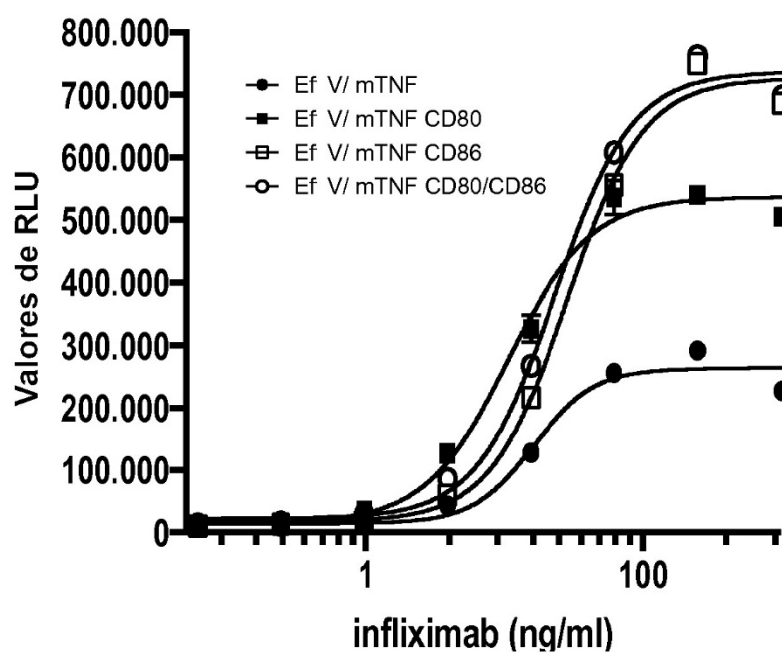
	Ef V CD28/ EGFR	Ef V CD28/ EGFR CD80	Ef V CD28/ EGFR CD86	Ef V CD28/ EGFR CD80/CD86	Ef V NFAT/ A431
Asíntota superior	46.735	555.768	1.020.128	1.373.801	2.139.934
Asíntota inferior	2.523	11.696	10.112	16.454	30.242
Pendiente de Hill	1,598	1,561	1,036	1,179	1,46
CE50	24,15	8,249	16,58	21,57	37,09
Veces de inducción	17	50	86	86	63

Fig. 13A



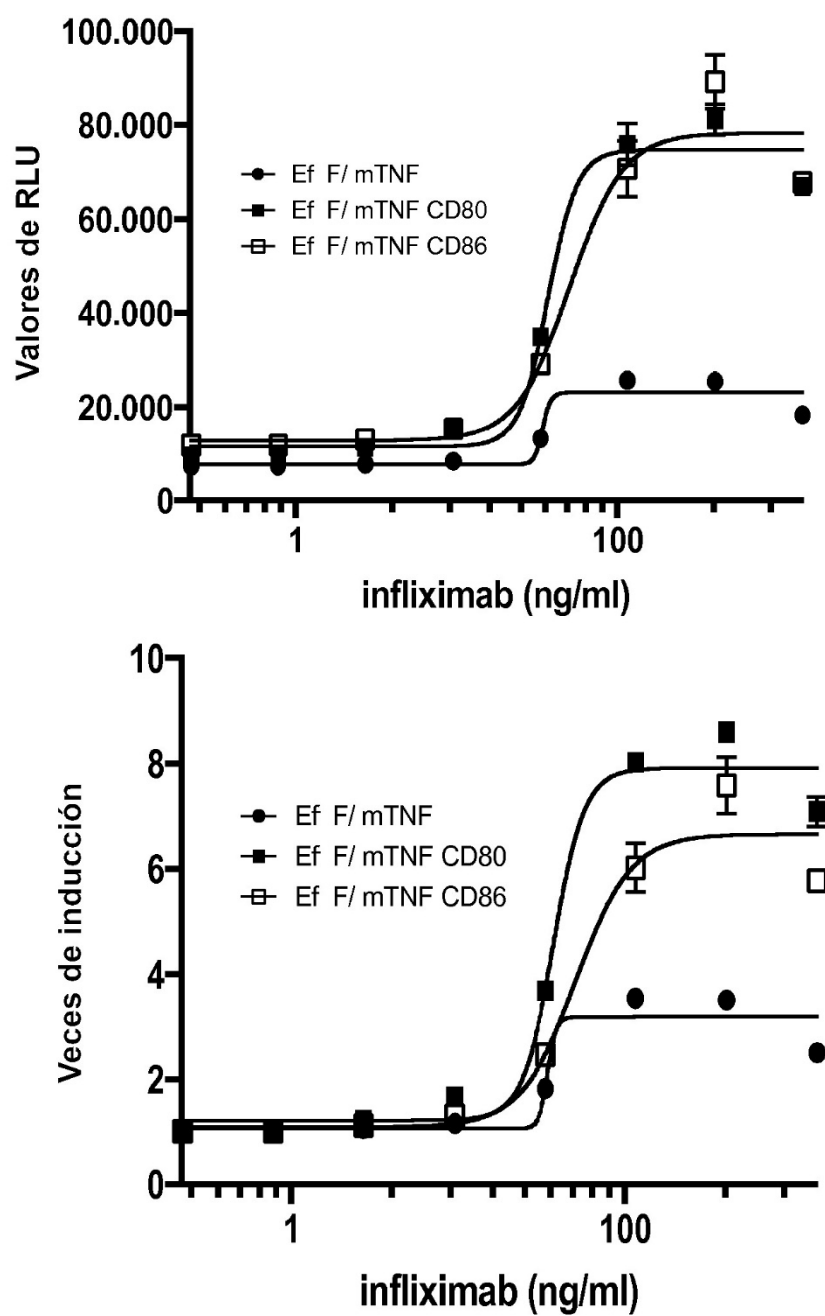
	Ef F CD28/EGFR	Ef F CD28/EGFR CD86	Ef F NFAT/A431
Asíntota superior	7.644	46.294	186.111
Asíntota inferior	5.550	5.563	22.934
Pendiente de Hill		3,085	2,522
CE50		56	63,89
Veces de inducción		8	8

Fig. 13B



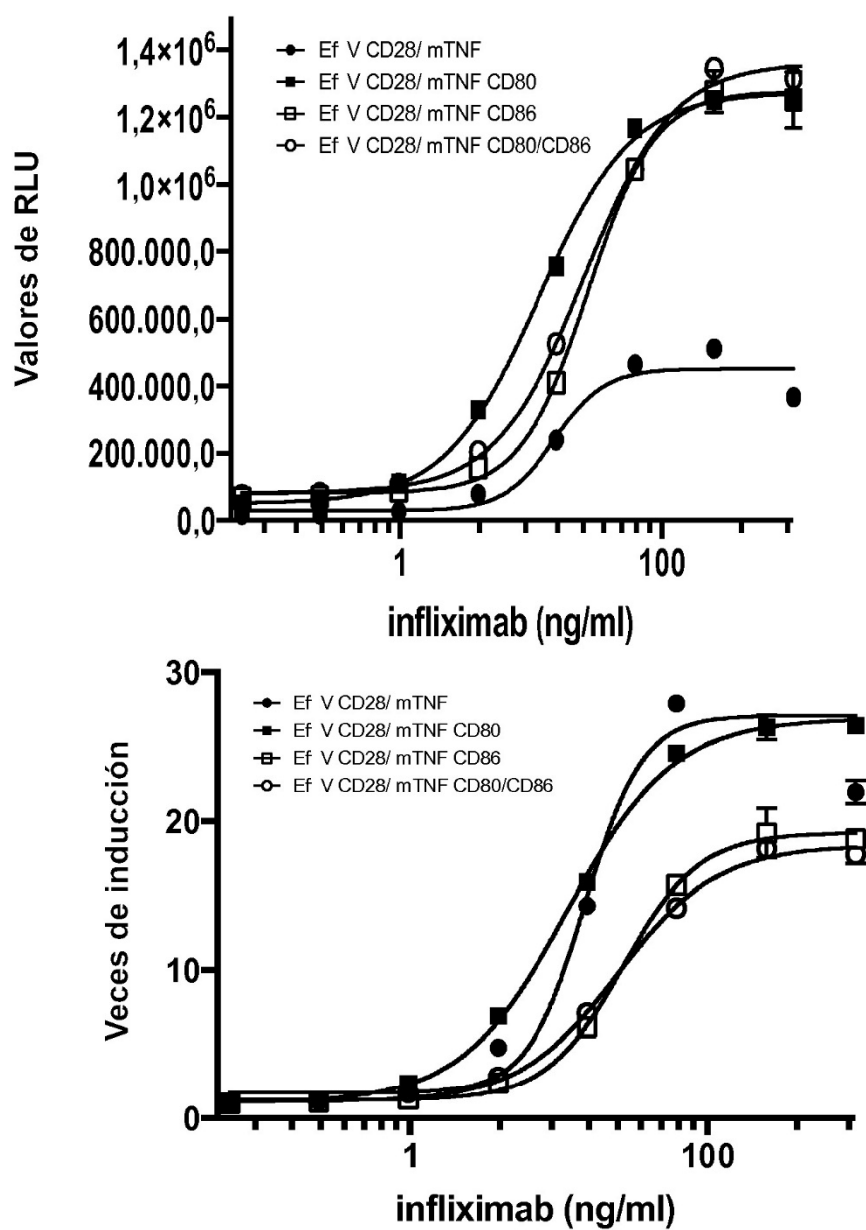
	Ef V/ mTNF	Ef V/ mTNF CD80	Ef V/ mTNF CD86	Ef V/ mTNF CD80/CD86
Asíntota superior	263.535	536.855	726.766	737.141
Asíntota inferior	7.272	8.224	10.319	12.532
Pendiente de Hill	1,987	1,461	1,57	1,552
CE50	16,28	10,67	28,49	23,14
Veces de inducción	33	61	69	57

Fig. 14A



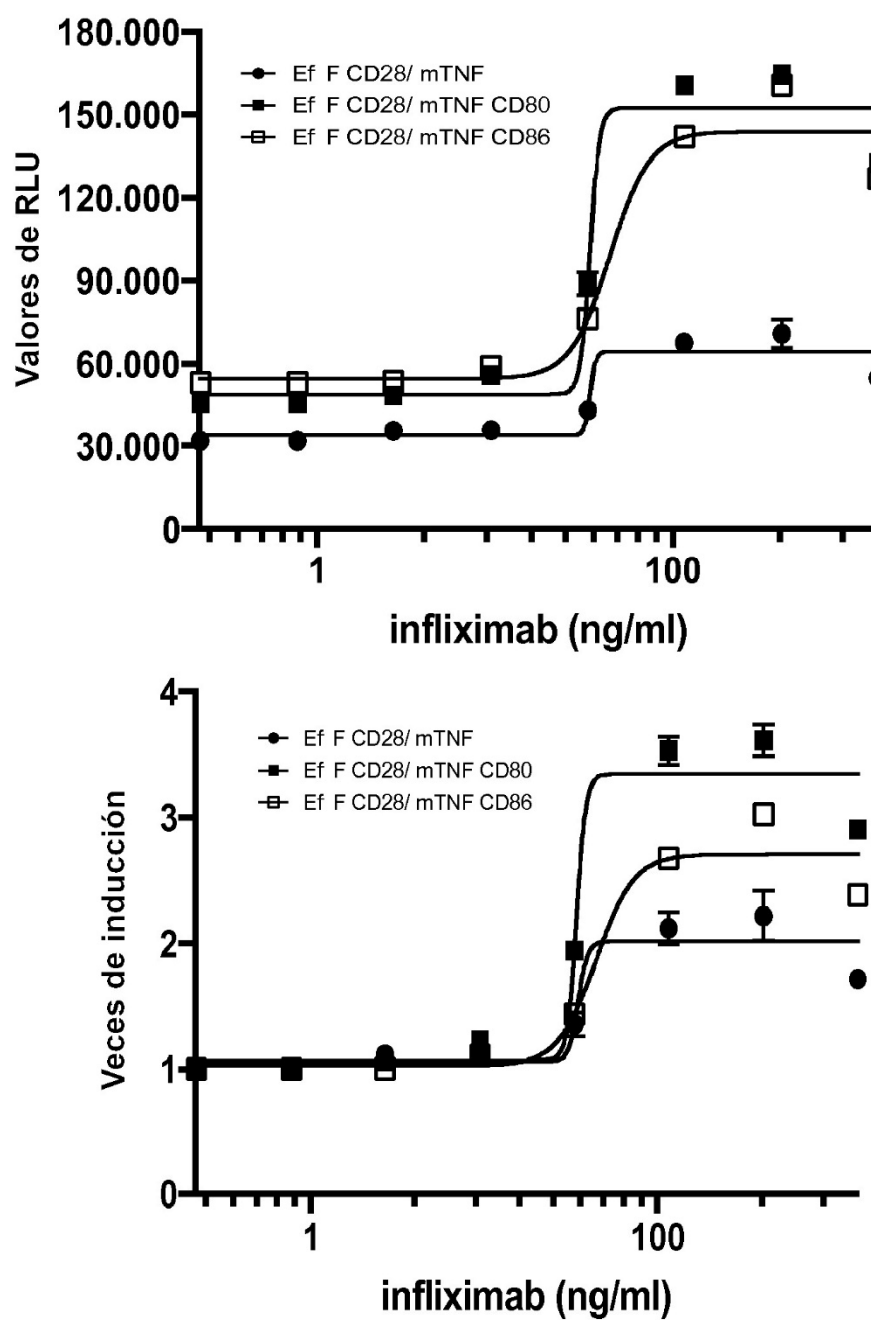
	Ef %/mTNF	Ef %/mTNF CD80	Ef %/mTNF CD86
Asíntota superior	23.133	74.702	78.293
Asíntota inferior	7.639	9.475	11.733
Pendiente de Hill	16,72	4,759	2,595
CE50	34,5	37,24	50,86
Veces de inducción	3,19	7,91	6,66

Fig. 14B



	Ef V CD28/ mTNF	Ef V CD28/ mTNF CD80	Ef V CD28/ mTNF CD86	Ef V CD28/ mTNF CD80/CD86
Asíntota superior	453.132	1.273.855	1.276.808	1.361.550
Asíntota inferior	18.931	50.855	65.344	75.734
Pendiente de Hill	2,23	1,216	1,696	1,287
CE50	15,03	11,36	27,09	25,29
Veces de inducción	27	26	19	18

Fig. 15A



	Ef %CD28/%TNF	Ef %CD28/%TNF%CD80	Ef %CD28/%TNF%CD86
Asíntota superior	64.400	152.500	143.841
Asíntota inferior	33.763	44.875	54.553
Pendiente de Hill	27,78	16,2	3,908
CE50	34,31	34,29	44,53
Veces de inducción	2,018	3,348	2,707

Fig. 15B

Tabla 1

Célula efectora	CD28 ⁺				CD28 ⁺⁺			
Célula diana	CD20 ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86	CD20 ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86
Mejores valores de ajuste								
Asintota superior	519,549	713,632	524,127	638,074	1,098,073	1,492,550	1,082,758	987,610
Asintota inferior	2235	2290	2065	2670	12,250	17,950	12,750	24,450
Pendiente de Hill	0,933	0,864	0,8285	0,887	0,9121	0,8319	0,8783	0,8462
CE ₅₀	2,143	4,326	3,502	2,815	2,034	4,518	2,771	2,951
Veces de inducción	232,9	312,2	253,9	239,7	83,15	83,45	85,38	40,34

Fig. 16

Tabla 2

Célula efectora	CD28 ⁺				CD28 ⁺⁺			
Célula diana	erbB2 ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86	erbB2 ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86
Mejores valores de ajuste								
Asintota superior	324.042	1.123.325	2.313.547	2.374.164	435.831	1.927.158	4.137.595	4.381.741
Asintota inferior	1.418	1.739	1.741	2.064	2.259	12.938	8.444	18.012
Pendiente de Hill	1,219	1,1	1,131	1,841	1,009	1,048	1,027	1,271
CE ₅₀	12,97	7,667	4,151	10,21	16,45	4,74	2,191	9,578
Veces de inducción	297	658	1.314	1.142	166	168	476	228

Fig. 17

Tabla 3

Célula efectora	CD28 ⁺				CD28 ⁺⁺			
Célula diana	EGFR ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86	EGFR ⁺⁺	CD80	CD86	CD80/86
Mejores valores de ajuste								
Asíntota superior	26.648	250.063	514.312	847.023	46.735	555.768	1.020.128	1.373.801
Asíntota inferior	1.007	2.238	2.154	1.982	2523	11.696	10.112	16.454
Pendiente de Hill	1,547	1,34	1,258	1,68	1,598	1,561	1,036	1,179
CE ₅₀	21,6	9,914	18,26	26,74	24,15	8,249	16,58	21,57
Veces de inducción	27	109	256	485	17	50	86	86

Fig. 18

Tabla 4

Célula efectora	CD28 ⁺				CD28 ⁺⁺			
	mTNF α^{++}	CD80	CD86	CD80/86	mTNF α^{++}	CD80	CD86	CD80/86
<i>Mejores valores de ajuste</i>								
Asíntota superior	263,535	536,855	726,766	737,141	453,132	1,273,855	1,276,808	1,361,550
Asíntota inferior	7,272	8,224	10,319	12,532	18,931	50,855	65,344	75,734
Pendiente de Hill	1,987	1,461	1,57	1,552	2,23	1,216	1,696	1,287
CE ₅₀	16,28	10,67	28,49	23,14	15,03	11,36	27,09	25,29
Veces de inducción	33	61	69	57	27	26	19	18

Fig. 19