

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 902**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2016 PCT/EP2016/056994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2016 E 16714843 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3277723**

54 Título: **Línea celular que sobreexpresa el antígeno CD303 humano**

30 Prioridad:

31.03.2015 FR 1552757
16.12.2015 FR 1562452

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2021

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des
Tropiques
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**FOURNIER, NATHALIE y
DE ROMEUF, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 819 902 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

Línea celular que sobreexpresa el antígeno CD303 humano

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las herramientas celulares destinadas a caracterizar la actividad *in vitro* o *in vivo* de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD303 humano, susceptibles de usarse en el tratamiento o en la prevención de tumores hematopoyéticos derivados de células dendríticas plasmocitoides (pDC) o enfermedades inflamatorias, o autoinmunes, que implican pDC. La invención se refiere en particular a líneas celulares que expresan la cadena gamma del receptor FcεRI y el antígeno CD303 humano, transfectándose la línea de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, y que presenta una fuerte expresión de CD303 humano en su superficie, como se reivindican en las reivindicaciones 1 a 4.

15 TÉCNICA ANTERIOR

Las células dendríticas (denominadas "DC" en toda la presente descripción) son unas células del sistema inmunitario presentadoras de antígenos (CPA). Bajo ciertas condiciones, las DC presentan unas prolongaciones citoplásmicas similares a las dendritas de las neuronas.

Las células dendríticas tienen dos funciones principales:

- la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa dirigida contra antígenos de los "no auto" (antígenos extraños), mediante la presentación de estos antígenos extraños a los linfocitos T; y
- el mantenimiento de la tolerancia central al "propio organismo", mediante la educación de los linfocitos T en el timo, mediante el procedimiento denominado de "selección negativa".

30 Las DC son capaces de diferenciarse en varias subpoblaciones, según los estímulos que reciben. Existen tres tipos principales de células DC: células DC convencionales, células DC plasmocitoides (llamadas "pDC") y células DC inflamatorias.

35 Las DC convencionales presentan los autoantígenos o no-autoantígenos en los órganos linfoides o en la periferia. Las DC inflamatorias, probablemente derivadas de monocitos sanguíneos, sólo aparecen en caso de estimulación después de una inflamación o una infección.

40 Las DC plasmocitoides (pDC) son circulantes, redondas y sin dendritas en el estado basal, pero adquieren dendritas después de la activación, generalmente por un antígeno viral. Después de la estimulación, producen una gran cantidad de interferones de clase I (IFN) y están principalmente implicadas en la respuesta antiviral o en enfermedades autoinmunes. En el plano fenotípico, se caracterizan especialmente por los siguientes marcadores: CD4+, CD11c-, Lin-, CD303+, CD304+.

45 Las pDC pueden ser el origen de tumores hematopoyéticos en los que adquieren un marcador suplementario (CD56). Se habla entonces de neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (abreviado como "BPDCN" por "Blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm"). Se habla también de tumores hematopoyéticos CD4+CD56+. Estos tumores hematopoyéticos son raros (un 1% de las leucemias agudas) y se presentan en forma de nódulos cutáneos asociados a una linfo-adenopatía o hinchamiento del bazo y a una citopenia frecuente. Las manifestaciones cutáneas van seguidas muy rápidamente por una infiltración de la médula ósea. Se admite ahora que las células hematopoyéticas origen de estos tumores son las pDC.

En el documento WO2012/080642 se ha propuesto utilizar unos anticuerpos anti-BDCA-2, es decir anti-CD303, para el tratamiento de estos tumores por depleción de las células tumorales.

55 Las pDC están también implicadas en ciertas enfermedades inflamatorias y, especialmente, en ciertas enfermedades autoinmunes, en particular a través de su secreción de IFN de tipo I.

60 Sin embargo, con el fin de tratar estas enfermedades de manera eficaz, es necesario disponer de anticuerpos monoclonales adecuados y que permitan una eliminación lo más eficaz posible de las pDC en seres humanos. Para ello, se necesitan unos anticuerpos quiméricos o humanizados con fuerte afinidad por el antígeno CD303 y capacidades efectoras (ADCC, CDC, fagocitosis, señalización mediante reticulación (cross-link) de CD303 por receptores Fc, en particular el receptor FcγRIIIa (también llamado CD16a) y/o apoptosis) que les permita eliminar las pDC en condiciones fisiológicas.

Actualmente, debido a un acceso limitado a las células de pacientes, y con el fin de garantizar una reproducibilidad de los ensayos, la caracterización de la eficacia de los anticuerpos anti-CD303 *in vitro* e *in vivo* se efectúa generalmente sobre líneas celulares tales como la línea celular CAL-1 o equivalente, derivadas de células de un paciente humano que padece BPDCN.

Sin embargo, los inventores se han dado cuenta de que las líneas disponibles expresan sólo un pequeño número de moléculas CD303 presentes en su superficie, menor que el de la mayoría de células tumorales de pacientes que padecen BPDCN, y que estas líneas celulares presentan, por lo tanto, sólo un bajo poder discriminatorio frente a los anticuerpos anti-CD303. En efecto, a una densidad antigénica demasiado baja, la actividad funcional de los anticuerpos es demasiado baja para poder poner en evidencia las diferencias de eficacia entre diferentes anticuerpos.

El documento WO2014/093396A1 describe la transfección de células CHO (células de ovario de hámster) por un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, y la utilización de esta línea en una prueba ADCC con anticuerpos anti-CD303. Los resultados presentados sugieren que la transfección de CD303 en las células CHO no es estable en el tiempo (Ejemplo 30), lo que se confirma en el artículo asociado posterior Pellerin *et al.* (EMBO Mol Med (2015) 7: 464-476, véase *Supplementary Materials and Methods, Cloning of Human and Cynomolgus BDCA2 and Expression in CHO cells*).

Por lo tanto, existe una necesidad real de proporcionar nuevas líneas celulares que expresen de manera estable el antígeno CD303 humano en su superficie y, especialmente, líneas celulares que tengan un poder discriminatorio mejorado a fin de poder seleccionar los anticuerpos anti-CD303 que presentan la actividad más importante.

RESUMEN DE LA INVENCION

Según un primer objeto, la presente invención se refiere a una línea celular que expresa la cadena gamma del receptor FcεRI y el antígeno CD303 humano, caracterizada por que dicha línea celular se transfecta de manera estable mediante un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y presenta una fuerte expresión de CD303 en su superficie, caracterizada por que dicha línea celular presenta al menos 10000 moléculas de CD303 humano por célula y por que dicha línea celular es:

a) una línea celular de células dendríticas plasmocitoides humanas (pDC) transfectada de manera estable mediante un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano; o

b) una línea de linfocitos humanos, transfectada de manera estable mediante un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o mediante dos vectores de expresión que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano.

La presente descripción también divulga un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano.

La presente descripción también divulga un kit que comprende dos vectores de expresión, comprendiendo cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica, respectivamente, el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano.

Según otro objeto, la invención se refiere a la utilización de la línea celular según la invención para caracterizar una actividad funcional de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, preferiblemente una actividad de tipo ADCC, secreción de citocinas, CDC, apoptosis y fagocitosis o para comparar la afinidad de unión de varios anticuerpos anti-CD303 al antígeno CD303 humano o los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por varios anticuerpos anti-CD303.

Según otro modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de ensayo de la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y unas células efectoras;

b) incubar durante un tiempo apropiado para permitir la lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a); y

c) medir el grado de lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a).

Según otro objeto, la invención consiste en un kit de caracterización de anticuerpos anti-CD303 que comprende la línea celular según la invención, y ventajosamente al menos un reactivo elegido entre células efectoras, IgG polivalentes y anti-anticuerpos anti-CD303 de referencia.

5 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Mapa vectorial pcDNA3.1 (-)

10 Figura 2. Expresión de CD303 en las células del conjunto 008-1 en el día 43. Los histogramas muestran las células marcadas con un anticuerpo anti-CD303 conjugado con PE (área llena) y con un anticuerpo isotipo de control conjugado con PE (línea).

15 Figura 3. Expresión de CD303 en las células del conjunto 008-1 después de la 3ª clasificación celular. Los histogramas muestran las células coloreadas con anticuerpos anti-CD303 conjugado con PE (área llena) y con anticuerpos de isotipo de control conjugado con PE (línea de puntos).

20 Figura 4. Expresión de CD303 en las células del conjunto 008-1 después de la 3ª clasificación celular y 2 meses de cultivo. Los histogramas muestran las células coloreadas con anticuerpos anti-CD303 conjugado con PE (área llena) y con anticuerpos de isotipo de control conjugado con PE (línea).

Figura 5. Expresión de CD303 mediante clones obtenidos después de la clonación por dilución límite. Los histogramas muestran las células marcadas con anticuerpos anti-CD303 conjugado con PE (derecha) y con anticuerpos de isotipo de control conjugado con PE (izquierda).

25 Figura 6. Marcado del conjunto de células CAL-1 transfectadas por un vector de expresión CD303 con un anticuerpo de isotipo de control PE o un anticuerpo anti-CD303-PE el día 22 después de la transfección.

Figura 7. Marcado de los clones NF-3C8 y NF-5G9 obtenidos después de la clonación el día 50 después de la transfección con un anticuerpo isotipo de control PE o un anticuerpo anti-CD303-PE.

30 Figura 8. Estabilidad de la fuerte expresión de CD303 por los clones NF-3C8 y NF-5G9 obtenidos por transfección de las células CAL-1 por un vector de expresión CD303. Evolución del marcado por un anticuerpo anti-CD303 PE de los clones NF-3C8 y NF-5G9 entre 2 y 12 semanas después del subcultivo en presencia o en ausencia de G418.

35 Figura 9. Estabilidad de la fuerte expresión de CD303 por los clones NF-3C8 y NF-5G9 obtenidos por transfección de las células CAL-1 por un vector de expresión CD303. Marcado por un anticuerpo anti-CD303 PE de los clones NF-3C8 (A) y NF-5G9 (B) a las 2 y 12 semanas después del subcultivo en presencia o en ausencia de G418.

Figura 10. Unión al antígeno CD303 humano expresado en NF-3C8 o NF-5G9 por los anticuerpos

40 Figura 11. Actividad ADCC mediante CD16a inducida por los anticuerpos quiméricos anti-CD303, 122A2, 114D1 o 102E9, por un anticuerpo quimérico de control o por el anticuerpo humanizado anti-CD303 BIIB059 en presencia de la línea CAL-1 no transfectada por un vector de expresión del antígeno CD303 humano (A) o del clon NF-3C8 obtenido después de la transfección de la línea CAL-1 por un vector de expresión del antígeno CD303 humano, selección y clonación (B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 *Línea celular que expresa la cadena gamma del receptor FcεRI y el antígeno CD303 humano, transfectada de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y que presenta una fuerte expresión de CD303 en su superficie.*

La presente invención se refiere a una línea celular tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4. La presente descripción también divulga una línea celular que expresa la cadena gamma del receptor FcεRI y el antígeno CD303 humano, caracterizada porque dicha línea celular se transfecta de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y que presenta en su superficie una fuerte expresión de CD303.

60 El antígeno CD303 humano es el miembro C de la 4ª familia del dominio de lectina de tipo C y también se denomina CLEC4 (por C-type lectin domain family 4, member C"); DLEC; HECL; BDCA2; CLECSF7; CLECSF11; o PRO34150 (véase la página EnterGene para el gen CLEC4). Se trata de una glucoproteína transmembranaria de tipo II de 213 aminoácidos, que comprende un dominio citoplasmático corto sin unidad de señalización evidente (aminoácidos 1-21), una región transmembranaria (aminoácidos 22-41), un dominio cuello (aminoácidos 42-82) y un dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos (CRD por "carbohydrate recognition domain"; aminoácidos 83-213) (Dzionic *et al.* 2001). La secuencia del ARNm que codifica esta proteína se puede encontrar en la base de datos de Genbank en su versión del 14 de febrero de 2002 con el número de acceso AF293615.1 (SEQ ID NO: 1), mientras

que la secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos Genbank en su versión del 14 de febrero de 2002 con el número de acceso AAL37036.1 (SEQ ID NO: 2).

Los inventores han constatado que para obtener una línea celular que exprese de manera estable el antígeno CD303 humano en su superficie, era indispensable la expresión de la cadena gamma del receptor FcεRI humano por la línea celular. Por tanto, para una línea celular que no expresa originalmente esta cadena gamma del receptor FcεRI humano, la cotransfección de la línea celular por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, y otro vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano o la transfección por un vector que comprende dos moléculas de ácido nucleico que codifican una la cadena gamma del receptor FcεRI humano y la otra el antígeno CD303 humano, es necesaria para obtener una línea celular que exprese de manera estable el antígeno CD303 humano en su superficie. Por el contrario, si la línea original ya expresa la cadena gamma del receptor FcεRI humano, la transfección de un único vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano es suficiente.

El experto en la materia conoce la secuencia que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano. Especialmente, la secuencia del ARNm que codifica esta proteína se puede encontrar en la base de datos de Genbank en su versión del 3 de mayo de 2014 con el número de acceso NM_004106.1 (SEQ ID NO: 3), mientras que la secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos Genbank en su versión del 3 de mayo de 2014 con el número de acceso NP_004097.1 (SEQ ID NO: 4). En esta base, el experto en la técnica sabe cómo diseñar secuencias nucleicas que codifican la cadena gamma del receptor FcεRI humano susceptibles de insertarse en un vector de expresión adecuado para la transfección de una línea celular.

Origen de la línea celular

La línea celular descrita en este documento puede derivarse de cualquier línea celular apropiada. Tal línea celular es preferentemente una línea celular de mamífero, e incluso más preferentemente una línea celular humana.

Entre las líneas celulares susceptibles de utilizarse para generar una línea descrita en este documento, se pueden citar especialmente las siguientes líneas habituales: SP2/0; YB2/0; IR983F; el mieloma humano de Namalwa; PERC6; las líneas CHO en particular CHO-K-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2; Jurkat; Vero; Molt-4; COS-7; 293-HEK; BHK; K6H6; NSO; SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

Si la línea celular expresa la cadena gamma del receptor FcεRI humano, la transfección de un único vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano es suficiente para generar una línea celular tal como se describe en este documento. En el caso contrario, la cotransfección de la línea celular por un primer vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y por otro vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano o la transfección por un vector que comprende dos moléculas de ácido nucleico que codifican, una la cadena gamma del receptor FcεRI humano y la otra el antígeno CD303 humano, es necesaria para obtener una línea celular. El experto en la materia es capaz de determinar qué línea celular expresa o no la cadena gamma del receptor FcεRI humano mediante experimentos de rutina (especialmente, PCR cuantitativa o marcado de anticuerpos).

Según un primer modo de realización ventajoso de la invención, la línea celular según la invención puede ser una línea celular de células dendríticas plasmocitoides humanas (pDC), transfectadas de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano. Las pDC expresan normalmente, de forma natural, la cadena gamma del receptor FcεRI y, por lo tanto, las líneas pDC humanas no necesitan transfectarse con un vector de expresión que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique la cadena gamma del receptor FcεRI humano. Sujeto a confirmación de la expresión de la cadena gamma del receptor FcεRI, es suficiente una transfección simple por un vector de expresión que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique el antígeno CD303 humano.

Ventajosamente, la línea celular según la invención es una línea CAL-1 o una línea equivalente transfectada de manera estable por un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano. En efecto, la línea celular CAL-1 (Maeda T *et al.*, Int J Hematol. Febrero de 2005; 81 (2): 148-54) es una línea celular que expresa naturalmente la cadena gamma del receptor FcεRI y que, por lo tanto, no necesita transfectarse con un vector de expresión que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique la cadena gamma del receptor FcεRI humano. La línea celular CAL-1 deriva de células de un paciente humano que padece BPDCN (T *et al.*, Int J Hematol. Febrero de 2005; 81 (2): 148-54 y JP 5011520). Las células CAL-1 se definen como pDC, que tienen el fenotipo Lin⁻HLA-DR⁺CD11c⁺CD123⁺CD4⁺CD56⁺. La línea celular CAL-1 se depositó según el Tratado de Budapest por la Universidad de Nagasaki (1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japón) en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository, NITE, (Chuoudai 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, en Japón, FERM P-20595 el 15 de julio de 2005, bajo el nombre CAL-1), y se caracterizó en detalle en la patente JP 5011520.

Cualquier otra línea de pDC humana, tal como otra línea derivada de células BPDCN de un paciente humano según el protocolo utilizado para obtener la línea CAL-1 descrita en Maeda T *et al.*, Int J Hematol. Febrero de 2005; 81 (2): 148-54 también se puede utilizar para obtener una línea según la invención mediante transfección estable de una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y selección de un clon apropiado. El protocolo que permite obtener una línea pDC humana a partir de células BPDCN de un paciente humano comprende en particular las siguientes etapas:

* unas células malignas primarias de BPDCN se obtienen a partir de la sangre periférica de un paciente diagnosticado de padecer BPDCN según la clasificación de la OMS. En particular, las PBMC (células mononucleadas de la sangre periférica) del paciente BPDCN se cultivan en un medio que contiene un 10% de suero fetal de ternera (SVF) y 2 mM de L-glutamina, sin IL-2 recombinante, con cambio de medio dos veces por semana, y sometido a un cultivo a largo plazo (varias semanas o meses).

* Las células que sobreviven después de un cultivo a largo plazo pueden clonarse después (por ejemplo, por dilución límite) para obtener una línea celular de larga duración en cultivo.

Tales líneas obtenidas según el protocolo descrito anteriormente se consideran como "equivalentes" a la línea CAL-1 en el sentido de la presente invención.

En un segundo modo de realización ventajoso de la invención, la línea celular según la invención es una línea de linfocitos T humanos, transfectada de manera estable por un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o por dos vectores de expresión, que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor. FcεRI humano. En efecto, para las líneas celulares que no expresan naturalmente la cadena gamma del receptor FcεRI, parece esencial transfectar estas últimas con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano para permitir obtener una línea que expresa de forma estable el antígeno CD303 en su superficie.

En este caso, la línea celular según la invención puede ser especialmente una línea Jurkat (Clon E6-1: ATCC® TIB - 152™, ECACC 88042803; Neo Jurkat: ATCC® CRL-2898™ que expresa un gen de resistencia a la neomicina), transfectada de manera estable por un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o por dos vectores de expresión que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano. También pueden usarse otras líneas celulares equivalentes accesibles para el experto en la materia.

Obtención de la línea

Se puede utilizar cualquier vector de expresión apropiado para una expresión en la línea celular seleccionada y, especialmente, en el caso de una línea de células de mamíferos o de una línea humana tal como la línea Jurkat o la línea CAL-1 de pDC humanas o una línea equivalente, cualquier vector de expresión que permita una expresión en las células de mamífero, tal como se describe a continuación en la parte relativa a los vectores o kits de vectores.

El vector o los vectores de expresión se pueden transfectar después en la línea celular de interés (especialmente, una línea de células de mamífero o una línea humana tal como la línea Jurkat o una línea humana de pDC) mediante cualquier tecnología apropiada conocida por el experto en la materia, y especialmente por nucleofección tal como se describe en el Ejemplo 1, o por cualquier otra tecnología apropiada, por ejemplo usando liposomas, polímeros catiónicos, lípidos catiónicos o por biolística.

Después de la transfección de un conjunto de células, las células que expresan efectivamente el antígeno CD303 en su superficie se pueden clasificar mediante citometría de flujo. Ventajosamente, el vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano también comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a un antibiótico), permitiendo así garantizar mantener la expresión del antígeno CD303 humano por la línea celular a lo largo del tiempo mediante el cultivo en un medio que selecciona las células que expresan el marcador de selección (medio con antibiótico en el caso de un gen de resistencia a antibióticos). Después de uno o más periodos de selección en un medio que selecciona las células que expresan el marcador de selección y uno o más procesos de clasificación de células, se pueden obtener unos clones que expresan el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano mediante clonación por dilución limitante. En lo anterior, la selección se basa únicamente en la expresión del antígeno CD303 humano. Esto está relacionado con el hecho de que la cadena gamma del receptor FcεRI humano parece necesaria para el mantenimiento de la expresión del antígeno CD303 humano en la superficie de las células. Sin embargo, se puede añadir una selección basada en otro marcador de selección presente en la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano para garantizar la coexpresión de las dos proteínas en la línea celular transfectada.

Ventajosamente, los transfectantes seleccionados tienen una expresión del CD303 representativa del CD303 expresado en pDC normales y/o de pacientes con enfermedades autoinmunes o leucemia de células pDC (BPDCN).

Es posible utilizar una línea celular ya transfectada de manera estable por un vector de expresión (pcDNA4/TO por ejemplo) de la cadena gamma del receptor FcεRI humano denominada línea "Fc de cadena γ", y transfectarla por otro vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano. Esto se aplica claramente a la línea Jurkat, cuya forma transfectada de la cadena FcεRI se denomina "Jurkat Fc de cadena γ".

Número de moléculas CD303 por célula

La línea celular según la invención o descrita en este documento se transfecta de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y presenta en su superficie una alta expresión del antígeno CD303 humano. En particular, la línea celular según la invención presenta al menos 10000 moléculas de CD303 humano por célula.

Por "alta expresión del antígeno CD303 humano" se entiende que la línea celular descrita en este documento, que ha sido transfectada de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, posee un nivel de expresión del antígeno CD303 humano superior al de la línea antes de la transfección estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano. Cuando la línea celular original no expresa CD303, la línea transfectada necesariamente cumple este criterio si expresa CD303 en su superficie. Cuando la línea celular original expresa ya CD303 (preferentemente a un nivel bajo), el nivel de expresión del antígeno CD303 humano de la línea transfectada descrita en este documento es ventajosamente al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% (factor 2 amplificación), al menos un 125%, al menos un 150%, al menos un 175%, al menos un 200% (factor de amplificación 3), al menos un 250%, al menos un 300% (factor de amplificación 4), al menos un 350%, al menos un 400% (factor de amplificación 5), al menos un 450%, al menos un 500% (factor de amplificación 6), al menos un 600% (factor de amplificación 7), al menos un 700% (factor de amplificación 8), al menos un 800% (factor de amplificación 9), al menos un 900% (factor de amplificación 10), o incluso al menos un 1000% (factor de amplificación 11) mayor que el de la línea antes de la transfección estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano. El nivel de expresión puede expresarse en particular en el número de moléculas del antígeno CD303 humano por célula.

El número de moléculas de antígeno CD303 humano por célula se puede determinar mediante citometría de flujo, especialmente con la ayuda del kit Qifikit comercializado por Dako, que permite determinar un número de sitios antigénicos por célula de entre 1000 y 1 000 000, y de anticuerpos murinos anti (CD303 humano). El principio del ensayo es el siguiente:

* Las células se marcan con un anticuerpo monoclonal primario de ratón dirigido contra el antígeno CD303 humano. En un tubo de ensayo separado, las células se marcan con un anticuerpo monoclonal primario control de ratón (no pertinente). Después, las células y las perlas de ajuste y de calibración del kit se etiquetan, en paralelo, con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína.

* El anticuerpo primario utilizado para marcar las células se utiliza a una concentración de saturación. Las condiciones de saturación se determinan efectuando unos estudios de titulación de cada anticuerpo monoclonal primario de ratón utilizando el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína. El anticuerpo primario puede ser cualquier isotipo de IgG de ratón. En estas condiciones, el número de moléculas de anticuerpo primario unidas corresponde al número de sitios antigénicos presentes en la superficie celular.

* El anticuerpo secundario se utiliza también a una concentración de saturación. Por lo tanto, la fluorescencia se correlaciona con el número de moléculas de anticuerpos primarios unidos sobre células y perlas. Después, las muestras se analizan en el siguiente orden:

◦ Tubo 1 (perlas de ajuste): esta muestra se utiliza para establecer la ventana de análisis. Las perlas de ajuste comprenden una mezcla de perlas en blanco (sin sitio antigénico) y perlas que expresan un alto nivel de sitios antigénicos.

◦ Tubo 2 (perlas de calibración): esta muestra se utiliza para la construcción de la curva de calibración (intensidad media de fluorescencia (MFI)) frente a ABC (para "Antibody-Binding Capacity", es decir capacidad de unión del anticuerpo).

◦ Las células se analizan después en el citómetro de flujo y se calcula la densidad del antígeno en las células (valor ABC) basándose en la ecuación de la curva de calibración.

La línea celular descrita en este documento presenta en su superficie al menos 10000 moléculas de CD303 humano por célula, preferiblemente entre 10000 y 500000, entre 10000 y 480000, entre 10000 y 460000, entre 10000 y 440000,

220000, entre 140000 y 200000, entre 140000 y 180000, entre 140000 y 160000, entre 240000 y 500000, entre 160000 y 480000, entre 160000 y 460000, entre 160000 y 440000, entre 160000 y 420000, entre 160000 y 400000, entre 160000 y 380000, entre 160000 y 360000, entre 160000 y 340000, entre 160000 y 320000, entre 160000 y 300000, entre 160000 y 280000, entre 160000 y 260000, entre 160000 y 240000, entre 160000 y 220000, entre 160000 y 200000, entre 160000 y 180000, entre 180000 y 500000, entre 180000 y 480000, entre 180000 y 460000, entre 180000 y 440000, entre 180000 y 420000, entre 180000 y 400000, entre 180000 y 380000, entre 180000 y 360000, entre 180000 y 340000, entre 180000 y 320000, entre 180000 y 300000, entre 180000 y 280000, entre 180000 y 260000, entre 180000 y 240000, entre 180000 y 220000, entre 180000 y 200000, entre 200000 y 500000, entre 200000 y 480000, entre 200000 y 460000, entre 200000 y 440000, entre 200000 y 420000, entre 200000 y 400000, entre 200000 y 380000, entre 200000 y 360000, entre 200000 y 340000, entre 200000 y 320000, entre 200000 y 300000, entre 200000 y 280000, entre 200000 y 260000, entre 200000 y 240000, entre 200000 y 220000, entre 220000 y 500000, entre 220000 y 480000, entre 220000 y 460000, entre 220000 y 440000, entre 220000 y 420000, entre 220000 y 400000, entre 220000 y 380000, entre 220000 y 360000, entre 220000 y 340000, entre 220000 y 320000, entre 220000 y 300000, entre 220000 y 280000, entre 220000 y 260000, entre 220000 y 240000, entre 220000 y 220000, entre 240000 y 500000, entre 240000 y 480000, entre 240000 y 460000, entre 240000 y 440000, entre 240000 y 420000, entre 240000 y 400000, entre 240000 y 380000, entre 240000 y 360000, entre 240000 y 340000, entre 240000 y 320000, entre 240000 y 300000, entre 240000 y 280000, entre 240000 y 260000, entre 260000 y 500000, entre 260000 y 480000, entre 260000 y 460000, entre 260000 y 440000, entre 260000 y 420000, entre 260000 y 400000, entre 260000 y 380000, entre 260000 y 360000, entre 260000 y 340000, entre 260000 y 320000, entre 260000 y 300000, entre 260000 y 280000, entre 280000 y 500000, entre 280000 y 480000, entre 280000 y 460000, entre 280000 y 440000, entre 280000 y 420000, entre 280000 y 400000, entre 280000 y 380000, entre 280000 y 360000, entre 280000 y 340000, entre 280000 y 320000, entre 280000 y 300000, entre 280000 y 280000, entre 280000 y 260000, entre 280000 y 240000, entre 280000 y 220000, entre 280000 y 200000, entre 300000 y 500000, entre 300000 y 480000, entre 300000 y 460000, entre 300000 y 440000, entre 300000 y 420000, entre 300000 y 400000, entre 300000 y 380000, entre 300000 y 360000, entre 300000 y 340000, entre 300000 y 320000, entre 320000 y 500000, entre 320000 y 480000, entre 320000 y 460000, entre 320000 y 440000, entre 320000 y 420000, entre 320000 y 400000, entre 320000 y 380000, entre 320000 y 360000, entre 320000 y 340000, entre 320000 y 320000, entre 320000 y 300000, entre 320000 y 280000, entre 320000 y 260000, entre 320000 y 240000, entre 320000 y 220000, entre 320000 y 200000, entre 340000 y 500000, entre 340000 y 480000, entre 340000 y 460000, entre 340000 y 440000, entre 340000 y 420000, entre 340000 y 400000, entre 340000 y 380000, entre 340000 y 360000, entre 340000 y 340000, entre 340000 y 320000, entre 340000 y 300000, entre 340000 y 280000, entre 340000 y 260000, entre 340000 y 240000, entre 340000 y 220000, entre 340000 y 200000, entre 360000 y 500000, entre 360000 y 480000, entre 360000 y 460000, entre 360000 y 440000, entre 360000 y 420000, entre 360000 y 400000, entre 360000 y 380000, entre 360000 y 360000, entre 360000 y 340000, entre 360000 y 320000, entre 360000 y 300000, entre 360000 y 280000, entre 360000 y 260000, entre 360000 y 240000, entre 360000 y 220000, entre 360000 y 200000, entre 380000 y 500000, entre 380000 y 480000, entre 380000 y 460000, entre 380000 y 440000, entre 380000 y 420000, entre 380000 y 400000, entre 380000 y 380000, entre 380000 y 360000, entre 380000 y 340000, entre 380000 y 320000, entre 380000 y 300000, entre 380000 y 280000, entre 380000 y 260000, entre 380000 y 240000, entre 380000 y 220000, entre 380000 y 200000, entre 400000 y 500000, entre 400000 y 480000, entre 400000 y 460000, entre 400000 y 440000, entre 400000 y 420000, entre 400000 y 400000, entre 400000 y 380000, entre 400000 y 360000, entre 400000 y 340000, entre 400000 y 320000, entre 400000 y 300000, entre 400000 y 280000, entre 400000 y 260000, entre 400000 y 240000, entre 400000 y 220000, entre 400000 y 200000, entre 420000 y 500000, entre 420000 y 480000, entre 420000 y 460000, entre 420000 y 440000, entre 420000 y 420000, entre 420000 y 400000, entre 420000 y 380000, entre 420000 y 360000, entre 420000 y 340000, entre 420000 y 320000, entre 420000 y 300000, entre 420000 y 280000, entre 420000 y 260000, entre 420000 y 240000, entre 420000 y 220000, entre 420000 y 200000, entre 440000 y 500000, entre 440000 y 480000, entre 440000 y 460000, entre 440000 y 440000, entre 440000 y 420000, entre 440000 y 400000, entre 440000 y 380000, entre 440000 y 360000, entre 440000 y 340000, entre 440000 y 320000, entre 440000 y 300000, entre 440000 y 280000, entre 440000 y 260000, entre 440000 y 240000, entre 440000 y 220000, entre 440000 y 200000, entre 460000 y 500000, entre 460000 y 480000, entre 460000 y 460000, entre 460000 y 440000, entre 460000 y 420000, entre 460000 y 400000, entre 460000 y 380000, entre 460000 y 360000, entre 460000 y 340000, entre 460000 y 320000, entre 460000 y 300000, entre 460000 y 280000, entre 460000 y 260000, entre 460000 y 240000, entre 460000 y 220000, entre 460000 y 200000, entre 480000 y 500000 moléculas de CD303 humano por célula.

Según un modo de realización preferido, la línea celular según la invención presenta en su superficie entre 20000 y 60000, preferentemente entre 25000 y 50000 moléculas de CD303 humano por célula. En efecto, tales números de moléculas de CD303 humano por célula hacen posible discriminar de manera eficaz y reproducible los anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD303 humano.

Vector doble o kit de dos vectores

También se describe un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano, respectivamente, están presentes en dos vectores de expresión independientes.

También se describe un kit de transfección que comprende un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o dos vectores de expresión que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano.

Cada vector descrito en este documento o incluido en un kit de transfección descrito en este documento comprende los elementos necesarios para la expresión de dicha molécula de ácido nucleico y, especialmente, un promotor, un codón de inicio de la transcripción, secuencias de terminación y secuencias reguladoras de la transcripción adecuadas. Estos elementos varían dependiendo del hospedante que sirve para la expresión y se seleccionan fácilmente por un experto en la materia en vista de sus conocimientos generales. Especialmente, el vector puede ser plasmídico o viral.

En el caso de una línea celular de mamífero o de una línea humana tal como la línea Jurkat o una línea pDC humana tal como CAL-1, se podrá utilizar cualquier vector de expresión que permita la expresión en células de mamífero.

Unos ejemplos de tales vectores incluyen el vector pcDNA4/TO (Invitrogen) usado para expresar la cadena gamma del receptor FcεRI humano en una línea Jurkat E6-1 (ATCC® TIB -152™, ECACC 88042803), o el vector pcDNA3.1 (-) utilizado en el Ejemplo 1 para expresar el antígeno CD303 humano.

Usos

Según otro objeto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar una actividad funcional de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, preferiblemente una actividad del tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis y fagocitosis o para comparar la afinidad de unión de varios anticuerpos anti-CD303 al antígeno CD303 humano, o los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por varios anticuerpos anti-CD303.

Según otro objeto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar las capacidades funcionales (especialmente las capacidades de tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis y fagocitosis) de las células efectoras de un sujeto humano, en particular un sujeto humano que padece BPDCN o una enfermedad autoinmune.

Caracterización de anticuerpos anti-CD303

Anticuerpos anti-CD303 susceptibles de caracterizarse con la ayuda de las células según la invención

Por "anticuerpo" se entiende una molécula que comprende al menos un dominio de unión para un antígeno dado y un dominio constante que comprende un fragmento Fc capaz de unirse a los receptores FcR. En la mayoría de los mamíferos, tales como los humanos y los ratones, un anticuerpo se compone de 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras unidas entre sí por un número variable de puentes disulfuro que aseguran la flexibilidad de la molécula. Cada cadena ligera está constituida de un dominio constante (CL) y de un dominio variable (VL); componiéndose las cadenas pesadas de un dominio variable (VH) y de 3 o 4 dominios constantes (CH1 a CH3 o CH1 a CH4) según el isotipo del anticuerpo. Los dominios variables están implicados en el reconocimiento del antígeno, mientras que los dominios constantes están implicados en las propiedades biológicas, farmacocinéticas y efectoras del anticuerpo.

La región variable difiere de un anticuerpo a otro. En efecto, los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se generan por recombinación de tres y dos segmentos génicos distintos, respectivamente, denominados VH, DH y JH-CH para la cadena pesada, y VL y JL-CL para la cadena ligera. Los segmentos CH y CL no participan en la recombinación y forman las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente. Las recombinaciones de los segmentos VH-DH-JH y VL-JL forman las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente. Las regiones VH y VL poseen, cada una, 3 zonas hipervariables o regiones que determinan la complementariedad (CDR), denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, siendo la región CDR3 la más variable, ya que se sitúa a nivel de la zona de recombinación. Estas tres regiones CDR, y particularmente la región CDR3, se encuentran en la parte del anticuerpo que estará en contacto con el antígeno y, por lo tanto, son muy importantes para el reconocimiento del antígeno. Por tanto, los anticuerpos que conservan las tres regiones CDR y cada una de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo conservan en gran medida la especificidad antigénica del anticuerpo original. En algunos casos, un anticuerpo que conserva sólo una de las CDR, y especialmente CDR3, también conserva la especificidad del anticuerpo original. Cada una de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 está precedida por las regiones FR1, FR2 y FR3 respectivamente, que corresponden a las regiones armazón (región armazón FR) que varían al menos de un segmento VH o VL a otro. La región CDR3 también está seguida por una región armazón FR4.

En el ámbito de la invención, cualquier anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano puede caracterizarse con la ayuda de las células según la invención, sean cuales sean las secuencias primarias de sus cadenas pesadas y ligeras, y especialmente sean cuales sean las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadenas pesadas y ligeras.

A diferencia de los dominios variables cuya secuencia varía en gran medida de un anticuerpo a otro, los dominios constantes se caracterizan por una secuencia de aminoácidos muy similar de un anticuerpo a otro, característica de la especie y del isotipo, con eventualmente algunas mutaciones somáticas. El fragmento Fc está compuesto naturalmente por la región constante de la cadena pesada con la exclusión del dominio CH1, es decir, de la región bisagra inferior y de los dominios constantes CH2 y CH3 o CH2 a CH4 (según el isotipo). En las IgG1 humanas, el fragmento Fc completo está compuesto por la parte C-terminal de la cadena pesada a partir del resto de cisteína en posición 226 (C226), estando la numeración de los restos de aminoácidos en el fragmento Fc en toda la presente descripción la del índice EU descrito en Edelman *et al.* 1969 y Kabat *et al.* 1991. Los fragmentos Fc que corresponden a otros tipos de inmunoglobulinas pueden identificarse fácilmente por el experto en la materia mediante alineaciones de secuencias.

El fragmento Fc está glicosilado a nivel del dominio CH2 con la presencia, en cada una de las 2 cadenas pesadas, de un N-glicano unido al resto de asparagina en la posición 297 (Asn 297).

Se conoce la glicosilación por influir en las funciones efectoras del anticuerpo, tales como sus actividades ADCC y CDC. Especialmente, se conoce en la actualidad que el contenido de fucosa de una composición de anticuerpos tiene un papel crucial en la capacidad de esta composición para inducir una fuerte respuesta ADCC a través del receptor FcγRIII (WO01/77181, Shields *et al.* 2002; Shinkawa *et al.* 2003). El anticuerpo a caracterizar funcionalmente en el

ámbito de la invención puede poseer un bajo contenido de fucosa, especialmente menor o igual al 65%. Por “contenido de fucosa” se entiende el porcentaje de formas fucosiladas dentro de los N-glicanos unidos al resto de Asn297 del fragmento Fc de cada cadena pesada de cada anticuerpo. Por “bajo contenido de fucosa” se entiende un contenido de fucosa menor o igual al 65%, incluso menor, pero no necesariamente nulo. El contenido de fucosa puede estar, por ejemplo, comprendido entre el 5 y el 65% o entre el 5 y el 50% o entre el 10 y el 50%. El anticuerpo, fragmento funcional o derivado del mismo también puede poseer diferentes tipos de glicosilación (N-glicanos del tipo oligomanosa o complejos biantenarios, proporción variable de restos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) intercalares o de restos de galactosa en el caso de N-glicanos del tipo complejo biantenarios), con la condición de poseer un bajo contenido de fucosa. Unos anticuerpos que poseen N-glicanos débilmente fucosilados se han obtenido especialmente mediante:

* Producción en YB2/0 (véase EP1176195A1, WO01/77181, Shinkawa *et al.* 2003) CHO Lec13 (véase Shields *et al.* 2002), EB66@ (Olivier *et al.* 2010), las líneas de hepatoma de rata H4-II-E (DSM ACC3129), H4-II-Es (DSM ACC3130) (véase WO2012/041768) y las líneas humanas NM-H9D8 (DSM ACC2806), NM-H9D8-E6 (DSM ACC 2807) y NM H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856) (véase WO2008/028686).

* Producción en una línea de CHO salvaje en presencia de pequeños ARN interferentes dirigidos contra FUT8 (Mori *et al.* 2004, Suzuki *et al.* 2007, Cardarelli *et al.* 2009, Cardarelli *et al.* 2010, Herbst *et al.* 2010), o GMD (gen que codifica el transportador de GDP-fucosa en Golgi, véase Imai-Nishiya *et al.* 2007)

* Producción en una línea CHO en la que se han eliminado los dos alelos del gen FUT8 que codifica la 1,6-fucosiltransferasa (Yamane-Ohnuki *et al.* 2004), o en la que se han eliminado los dos alelos del gen GMD que codifican el transportador de GDP-fucosa en el Golgi (Kanda *et al.* 2007),

* Producción en una línea CHO en la que el gen que codifica la enzima GnTIII ($\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminatransferasa III) se ha sobreexpresado por transgénesis (Umana *et al.* 1999). Además de una baja fucosilación, los N-glicanos obtenidos se caracterizan por un alto contenido de GlcNAc intercalar.

* Producción en plantas transgénicas (*N. benthamiana*), con una fuerte disminución del contenido de restos de $\beta(1,2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa gracias al uso de pequeños ARN interferentes (Forthal *et al.* 2010).

Además, o alternativamente, a un bajo contenido de fucosa, el anticuerpo a caracterizar funcionalmente en el ámbito de la invención puede poseer un alto contenido de galactosa.

Se entiende por “contenido de galactosa” o “grado de galactosilación” del anticuerpo, un porcentaje calculado a partir de un cromatograma de análisis de los N-glicanos liberados del anticuerpo, según la siguiente fórmula:

$$\text{contenido en galactosa} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{número de Gal}) \times (\% \text{ de superficie relativa})}{\sum_{i=1}^n (\text{número de A}) \times (\% \text{ de superficie relativa})} \times 100$$

en la que:

- “N” representa el número de picos de N-glicanos analizados en un cromatograma, por ejemplo, de un espectro de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase normal (NP HPLC),

- “número de Gal” representa el número de galactosas en la antena del glucano correspondiente al pico,

- “número de A” representa el número de antenas de N-acetil-glucosamina de la forma glicánica correspondiente al pico, y

- “% de superficie relativa” corresponde al porcentaje del área debajo del pico correspondiente.

Por “fuerte contenido de galactosa” se entiende un contenido de galactosa mayor o igual al 30%.

Los siguientes dominios de unión, situados en el Fc, son importantes para las propiedades biológicas del anticuerpo:

- dominio de unión al receptor FcRn, implicado en las propiedades farmacocinéticas (vida media *in vivo*) del anticuerpo:

Diferentes datos sugieren que ciertos restos situados en la interfaz de los dominios CH2 y CH3 están implicados en la unión al receptor FcRn.

- dominio de unión a la proteína del complemento C1q, implicado en la respuesta de CDC (por “citotoxicidad dependiente del complemento”): situado en el dominio CH2;

- dominio de unión a los receptores FcR, implicado en las respuestas de tipo fagocitosis o ADCC (por "citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo"): situado en el dominio CH2.

En el sentido de la invención, el fragmento Fc de un anticuerpo puede ser natural, tal como se ha definido anteriormente, o bien puede haber sido modificado de diversas formas, con la condición de que comprenda un dominio de unión a los receptores FcR funcional (receptores FcγR para IgG), y preferentemente un dominio de unión al receptor de FcRn funcional. Las modificaciones pueden incluir la delección de ciertas partes del fragmento Fc, siempre que este último contenga un dominio de unión a los receptores FcR funcional (receptores FcγR para IgG), y preferentemente un dominio de unión al receptor FcRn funcional.

Las modificaciones también pueden incluir varias sustituciones de aminoácidos susceptibles de afectar a las propiedades biológicas del anticuerpo, siempre que este último contenga un dominio de unión al receptor de FcR funcional, y preferentemente un dominio de unión al receptor de FcRn funcional. En particular, cuando el anticuerpo es una IgG, puede comprender mutaciones destinadas a aumentar la unión al receptor FcγRIIIa (CD16a), tal como se describe en los documentos WO00/42072, Shields *et al.* 2001, Lazar *et al.* 2006, WO2004/029207, WO2004/063351, WO2004/074455. También pueden estar presentes unas mutaciones que permiten aumentar la unión al receptor FcRn y por lo tanto la vida media *in vivo*, tal como se describe, por ejemplo, en Shields *et al.* 2001, Dall'Acqua *et al.* 2002, Hinton *et al.* 2004, Dall'Acqua *et al.* 2006 (a), WO00/42072, WO02/060919, WO2010/045193 o WO2010/106180. Otras mutaciones, como las que permiten disminuir o aumentar la unión a proteínas del complemento y, por lo tanto, la respuesta CDC, pueden estar presentes o no (véanse los documentos WO99/51642, WO2004/074455, Idusogie *et al.* 2001, Dall'Acqua *et al.* 2006 (b) y Moore *et al.* 2010).

En el ámbito de la invención, los anticuerpos a caracterizar pueden ser unos anticuerpos de cualquier tipo de animal (especialmente anticuerpos murinos), quiméricos, humanizados o humanos. Especialmente, para la caracterización de la afinidad por el antígeno, se puede utilizar cualquier tipo de anticuerpo (murinos u otros animales, quiméricos, humanizados o humanos). Para la caracterización de una actividad funcional, el anticuerpo a caracterizar es preferentemente un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, lo que permite así ensayar las funciones del anticuerpo en un ámbito humano (células efectoras humanas, suero humano, etc.).

Por anticuerpo "quimérico", se entiende designar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie dada en asociación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie dada. De forma ventajosa, si la composición de anticuerpo monoclonal para su uso como medicamento comprende un anticuerpo monoclonal quimérico, este último comprende unas regiones constantes humanas. Partiendo de un anticuerpo no humano, se puede preparar un anticuerpo quimérico usando las técnicas de recombinación genética bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico podría realizarse clonando por la cadena pesada y la cadena ligera un ADN recombinante que comprende un promotor y una secuencia que codifica la región variable del anticuerpo no humano y una secuencia que codifica la región constante de un anticuerpo humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, se puede hacer referencia, por ejemplo, al documento Verhoeven *et al.* 1988.

Por anticuerpo "humanizado" se entiende designar un anticuerpo que contiene unas regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, derivándose las otras partes de la molécula de anticuerpo de uno (o más) anticuerpos humanos. Además, algunos de los restos de los segmentos de esqueleto (denominados FR) pueden modificarse para conservar la afinidad de unión (Jones *et al.* 1986; Verhoeven *et al.* 1988; Riechmann *et al.* 1988). Los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como las tecnologías de "CDR grafting", "resurfacing", de superhumanización, de "Human string content", de "FR libraries", de "Guided selection", de "shuffling FR" y de "Humanengineering", tal como se resume en la revista de Almagro *et al.* 2008.

En el ámbito de la invención, los anticuerpos a caracterizar son ventajosamente unos anticuerpos monoclonales. Por "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se entiende una composición que comprende unas moléculas de anticuerpo que tienen una especificidad antigénica única e idéntica. Las moléculas de anticuerpos presentes en la composición son susceptibles de variar a nivel de sus modificaciones postraduccionales y, especialmente, a nivel de sus estructuras de glicosilación o de su punto isoeléctrico, pero todas han sido codificadas por las mismas secuencias de cadena pesada y ligera, y, por lo tanto, antes de cualquier modificación postraduccionales, tienen la misma secuencia proteica. Algunas diferencias de secuencias proteicas, relacionadas con modificaciones postraduccionales (como por ejemplo la escisión de la lisina C-terminal de la cadena pesada, la desamidación de restos de asparagina y/o la isomerización de restos de aspartato), pueden no obstante existir entre las diferentes moléculas de anticuerpo presentes en la composición.

En el ámbito de la invención, los anticuerpos a caracterizar pueden ser de varios isotipos. En efecto, los anticuerpos pueden ser de varios isotipos, en función de la naturaleza de su región constante: las regiones constantes γ, α, μ, ε y δ corresponden respectivamente a las inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. Ventajosamente, el anticuerpo monoclonal a caracterizar en el plano funcional en el ámbito de la invención es de isotipo IgG. En efecto, este isotipo muestra una capacidad para generar una actividad ADCC ("Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity", o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo) en el mayor número de individuos (humanos). Las regiones constantes γ comprenden varios subtipos: γ1, γ2, γ3, estos tres tipos de regiones constantes tienen la particularidad de fijar el

complemento humano, y $\gamma 4$, creando así los subisotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Ventajosamente, el anticuerpo monoclonal a caracterizar en el plano funcional en el ámbito de la invención es de isotipo IgG1 o IgG3, preferentemente IgG1.

- 5 El anticuerpo a caracterizar en el plano funcional en el ámbito de la invención se puede producir a partir de cualquier célula hospedante, de cualquier animal transgénico no humano o de cualquier planta transgénica apropiada.

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD303 humano expresado por la línea celular según la invención que se van a caracterizar pueden estar destinados al tratamiento o a la prevención de tumores hematopoyéticos que expresan el antígeno CD303. Se trata, especialmente, de neoplasias de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), de fenotipo CD4 +, CD11c-, Lin-, CD303 +, CD304 +, CD56 +.

Estos anticuerpos también pueden estar destinados al tratamiento o a la prevención de enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedades autoinmunes, enfermedades que implican a los pDC y más particularmente enfermedades que implican una secreción de IFN- α por pDC, tales como dermatitis atópica, dermatitis de contacto, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, diabetes tipo 1b, trombocitopenia autoinmune (o trombocitopenia) (especialmente púrpura trombocitopénica idiopática o PTI), esclerodermia sistémica (también denominada esclerodermia sistémica progresiva o esclerosis sistémica), artritis reumatoide.

20 En el ámbito de la presente invención, las líneas celulares según la invención permiten, por lo tanto, evaluar la actividad funcional de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano o comparar la afinidad de varios anticuerpos anti-CD303 por el antígeno CD303 humano o epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por varios anticuerpos anti-CD303.

25 *Caracterización de la actividad de ADCC*

En un primer modo de realización, el uso de las líneas celulares según la invención tiene como objetivo caracterizar la actividad ADCC del anticuerpo anti-CD303 humano. Así, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano.

30 Por "actividad ADCC" (siendo ADCC la abreviatura de "antibody dépendent cellular cytotoxicity", o "citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo") se entiende la capacidad del anticuerpo para inducir la muerte de las células diana (en este documento, la células de la línea celular según la invención) en presencia de células efectoras del sistema inmunológico, por su unión, por un lado, a las células diana por medio de sus partes variables que se unen al antígeno situado en la superficie de las células diana, y, por otro lado, a las células efectoras mediante la unión de su fragmento Fc a un receptor Fc (FcR, Fc γ R en el caso de IgG) situado en la superficie de las células efectoras. La medición de la actividad ADCC de un anticuerpo se realiza mediante técnicas convencionales. Especialmente, en una realización, la invención se refiere a un procedimiento de ensayo de la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

- 40 a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y unas células efectoras;
- 45 b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a); y
- c) medir el grado de lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a).

50 En la etapa a), la línea celular según la invención (células diana) se pone en contacto con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano a caracterizar (tal como se ha descrito anteriormente) y unas células efectoras.

En el ámbito de la caracterización de la actividad de ADCC, las células efectoras deben ser capaces de inducir una lisis de las células diana. Puede tratarse de monocitos, macrófagos, linfocitos T o células NK. Todas estas células están presentes en las PBMC (abreviatura de "Peripheral blood mononuclear cells" es decir células mononucleadas de sangre periférica) y, por lo tanto, se pueden utilizar las PBMC. Las células efectoras utilizadas son compatibles con los anticuerpos a caracterizar y, por lo tanto, son de la misma especie que el fragmento Fc del anticuerpo anti-CD303 humano a caracterizar.

60 En el caso de las IgG, la ADCC a través del receptor Fc γ R1IIIA es conocida por ser esencial para una buena actividad *in vivo* y, por lo tanto, la prueba de ADCC según la invención mide ventajosa y específicamente la ADCC a través del receptor Fc γ R1IIIA. Las células efectoras expresan en su mayoría dos receptores Fc γ R capaces de inducir una respuesta ADCC: el receptor con fuerte afinidad para el fragmento Fc de IgG Fc γ R1 y el receptor con baja afinidad para el fragmento Fc de IgG Fc γ R1IIIA. Las células NK son una excepción y expresan solamente el receptor Fc γ R1IIIA. Por lo tanto, para medir específicamente la ADCC a través del receptor Fc γ R1IIIA, es posible utilizar unas células purificadas como células efectoras. Alternativamente, también es posible usar células efectoras que expresan los dos receptores Fc γ R1 y Fc γ R1IIIA (o una mezcla de células que expresan, para algunas, los dos receptores Fc γ R1 y Fc γ R1IIIA

y, para otras, únicamente el receptor FcγRIIIa) y saturar los receptores FcγRI que tienen una fuerte afinidad para el fragmento Fc de las IgG mediante la adición en el medio de reacción de IgG polivalentes, es decir de IgG policlonales de múltiples especificidades antigénicas, purificadas a partir de plasma. Cuando se usan células efectoras humanas, es posible, especialmente usar IVIG, o inmunoglobulinas humanas normales, IgG polivalentes, medicamento usado en el tratamiento de ciertas patologías autoinmunes.

Las células diana (células que expresan en su superficie el antígeno CD303 humano reconocido por el anticuerpo a ensayar, en este caso las células de la línea celular según la invención) pueden haberse marcado previamente intracelularmente con un marcador que permite la etapa c) para medir el número de células diana efectivamente lisadas. Se puede utilizar cualquier marcador adecuado, tal como un marcador radiactivo, fluorescente, luminiscente o cromogénico. De manera alternativa, las células diana pueden no estar marcadas previamente. Se puede utilizar entonces el análisis de una proteína presente en las células diana (tal como la enzima LDH presente en todos los tipos de células) para medir el número de células lisadas en la etapa c).

Las células diana (células que expresan en su superficie el antígeno CD303 humano reconocido por el anticuerpo a ensayar, en este caso las células de la línea celular según la invención) y las células efectoras están presentes en una relación efectora/diana (E/C) próxima a las condiciones fisiológicas *in vivo*.

Se realiza generalmente una curva de dosis/respuesta de ADCC. Para ello, se ponen en contacto cantidades crecientes de anticuerpos con células diana y células efectoras en pocillos separados y se mide la ADCC a diferentes concentraciones de anticuerpos. Cada punto se realiza generalmente en varios ejemplares (especialmente por duplicado o triplicado).

También se realizan controles negativos, generalmente:

* lisis o liberación espontánea (SR), obtenida al poner las células diana en contacto únicamente con los anticuerpos (sin células efectoras),

* la citotoxicidad natural (NC) de las células efectoras, obtenida al poner las células diana en contacto únicamente con las células efectoras (sin anticuerpos).

También se puede utilizar un control positivo de lisis máxima, obtenido mediante la lisis de las células diana con un producto químico.

En la etapa b) se realiza una incubación (generalmente a 37°C) durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células diana (células de la línea celular según la invención). La duración de la incubación puede variar entre algunas horas y aproximadamente un día, especialmente entre 1 y 24 horas, en particular durante 4 a 24 horas. El experto en la materia sabe cómo determinar una duración óptima en función de las condiciones particulares de la prueba.

Finalmente, en la etapa c), se mide el grado de lisis de las células diana (células de la línea celular según la invención). Esto se realiza generalmente centrifugando las placas utilizadas para la puesta en contacto y la incubación, recuperando el sobrenadante y midiendo la cantidad de marcador intracelular de las células diana previamente marcadas liberadas en el medio, o la cantidad o la actividad de una proteína inicialmente presente en las células diana y liberada en el medio después de la lisis de las células diana.

Si se utilizan los controles mencionados anteriormente, el porcentaje de lisis se puede calcular entonces según una de las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de lisis } [(ER - SR) / (100 - SR)] - [(NC - SR) / (100 - SR)] \text{ o}$$

$$\% \text{ de lisis } = ER - NC - SR$$

en las que SR y NC son tales como se han definido anteriormente, y ER corresponde a la lisis obtenida para la muestra de prueba.

Los resultados (% de lisis) se expresan en función del factor de dilución del anticuerpo. Para cada anticuerpo, se puede calcular un valor de "50% de actividad" o "CE50", que corresponde al factor de dilución del anticuerpo necesario para inducir el 50% del valor de meseta obtenido para este anticuerpo.

Un ejemplo preciso de un ensayo de ADCC a través del receptor FcγRIIIa según la invención es el siguiente:

Unas células Jurkat de cadena Fc Gamma-CD303 (35000 células/pocillo) o CAL-1 transfectadas de manera estable por un vector de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano se incuban en una placa de 96 pocillos de fondo plano con células NK, y unas concentraciones crecientes de anticuerpo anti-CD303 durante 4 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recoge el sobrenadante. La lisis de las

células diana inducida por los anticuerpos anti-CD303 se mide cromogénicamente cuantificando la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas (Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH).

5 El porcentaje de lisis se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis } [(ER - SR) / (100 - SR)] - [(NC - SR) / (100 - SR)]$$

10 en la que ER y SR representan respectivamente las liberaciones experimentales (ER) y espontánea (SR) de LDH, y NC representa la citotoxicidad natural de las células NK.

Los resultados (% de lisis) se expresan en función del factor de dilución del anticuerpo. Para cada anticuerpo, el valor de "50% de actividad" corresponde al factor de dilución del anticuerpo necesario para inducir el 50% del valor de meseta obtenido para este anticuerpo. Este valor se puede calcular con el programa PRISM.

15 *Caracterización de la actividad de inducción de la secreción de citoquinas*

20 En otro modo de realización, el uso de las líneas celulares según la invención tiene como objetivo caracterizar la actividad de inducción de la secreción de citoquinas del anticuerpo anti-CD303 humano. Por tanto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar la actividad de inducción de la secreción de citoquinas de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano.

25 Por "actividad de inducción de la secreción de citoquinas" se entiende la capacidad del anticuerpo para inducir la secreción de diferentes citoquinas por células efectoras del sistema inmunitario.

30 La medición de la actividad de inducción de la secreción de citoquinas de un anticuerpo se realiza mediante técnicas convencionales. Especialmente, en un modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de prueba de la actividad para inducir la secreción de citoquinas de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

- 35 a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y las células efectoras;
- b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la secreción por las células efectoras de al menos una citoquina; y
- c) medir la tasa de secreción de al menos una citoquina.

40 En la etapa a), la línea celular según la invención (células diana) se pone en contacto con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano a caracterizar (tal como se ha descrito anteriormente) y las células efectoras. Las células efectoras susceptibles de utilizarse y las condiciones de puesta en contacto son las mismas que las susceptibles de utilizarse para la caracterización de ADCC (véase anteriormente).

45 En la etapa b), se realiza una incubación (generalmente a 37°C) durante un tiempo adecuado para permitir la secreción por las células efectoras de al menos una citoquina. La duración de la incubación puede variar entre algunas horas y aproximadamente un día, especialmente entre 1 y 24 horas, en particular durante 4 a 24 horas. El experto en la técnica sabe cómo determinar una duración óptima en función de las condiciones particulares de la prueba.

50 Finalmente, en la etapa c), se mide la tasa de secreción de al menos una citoquina, mediante tecnologías clásicas bien conocidas por el experto en la técnica, tales como el análisis por citometría de flujo a partir de sobrenadantes de cultivo. Las citoquinas ensayadas pueden incluir, especialmente, IL-2, IL-10, IFN-γ y TNF-α.

Caracterización de la actividad CDC (actividad a través del complemento)

55 En otro modo de realización, el uso de las líneas celulares según la invención tiene como objetivo caracterizar la actividad CDC del anticuerpo anti-CD303 humano. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar la actividad CDC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano.

60 Por "actividad CDC" (siendo CDC la abreviatura de "complement dependent cytotoxicity" es decir "citotoxicidad dependiente del complemento") se entiende la capacidad del anticuerpo para inducir la muerte de las células diana (en este caso, las células de la línea celular según la invención) en presencia de proteínas del complemento, por su unión, por un lado, a las células diana por medio de sus partes variables que se une al antígeno situado en la superficie de las células diana, y, por otro lado, a las proteínas del complemento.

La medición de la actividad CDC de un anticuerpo se realiza mediante técnicas convencionales. Especialmente, en un modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de ensayo de la actividad CDC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y con una fuente de proteínas del complemento;
- b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a); y
- 10 c) medir el grado de lisis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a).

En la etapa a), la línea celular según la invención (células diana) se pone en contacto con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano a caracterizar (tal como se ha descrito anteriormente) y una fuente de proteínas del complemento, generalmente un suero.

De nuevo en este caso, las células diana (células que expresan en su superficie el antígeno CD303 humano reconocido por el anticuerpo a ensayar, en este caso las células de la línea celular según la invención) pueden haberse marcado previamente intracelularmente con un marcador que permite en la etapa c) medir el número de células diana efectivamente lisadas. Se puede utilizar cualquier marcador adecuado, tal como un marcador radiactivo, fluorescente, luminiscente o cromogénico. Alternativamente, las células diana pueden no estar marcadas previamente. Se puede entonces usar el análisis de una proteína presente en las células diana (como la enzima LDH presente en todos los tipos de células) para medir el número de células lisadas en la etapa c).

De nuevo en este caso, se realiza generalmente una curva de dosis/respuesta de ADCC. Para ello, se ponen en contacto unas cantidades crecientes de anticuerpos con las células diana y las células efectoras en pocillos separados y se mide la ADCC a diferentes concentraciones de anticuerpos. Cada punto se realiza generalmente en varios ejemplares (especialmente por duplicado o triplicado).

También en este caso, se realizan generalmente unos controles que permiten estimar en la etapa c) el porcentaje de lisis obtenido en cada concentración de anticuerpo ensayada. Para ello, se realiza un rango de calibración obtenido con diferentes diluciones de células diana lisadas con un producto químico tal como un detergente (un 2% de Triton X-100, por ejemplo) que corresponden a diferentes porcentajes de lisis respectivamente (por ejemplo 100, 50, 25 y 0% de lisis). Los controles también incluyen la liberación espontánea (células diana solas).

En la etapa b), se realiza una incubación (generalmente a 37°C) durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células diana (células de la línea celular según la invención). El período de incubación puede variar entre algunas horas y aproximadamente un día, especialmente entre 1 y 24 horas, en particular durante 1 a 2 horas. El experto en la técnica sabe cómo determinar una duración óptima en función de las condiciones particulares de la prueba.

Finalmente, en la etapa c), se mide el grado de lisis de las células diana (células de la línea celular según la invención). Los resultados se calculan según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = (\% \text{ de lisis con anticuerpo y complemento}) - (\% \text{ de lisis con anticuerpo sin complemento})$$

Un ejemplo preciso de una prueba CDC según la invención es el siguiente:

Se incuban unas células Jurkat de cadena Fc Gamma-CD303 o CAL-1 transfectadas de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-CD303 (0 a 5000 ng/ml) y en presencia de suero de conejos jóvenes como fuente (dilución a 1/10).

Después de 2 horas de incubación a 37°C, se mide la cantidad de enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas con el kit "Cytotoxicity Detection LDH" (Roche Diagnostics ref. 11644793001).

Caracterización de la apoptosis inducida por anticuerpos

En otro modo de realización, el uso de las líneas celulares según la invención tiene como objetivo caracterizar la actividad de apoptosis del anticuerpo anti-CD303 humano. Por tanto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar la actividad de inducción de apoptosis de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano.

Por "actividad de apoptosis" se entiende la capacidad del anticuerpo a caracterizar para inducir la apoptosis de células que expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo.

La medición de la actividad de apoptosis de un anticuerpo se realiza mediante técnicas convencionales, tales como las pruebas de apoptosis clásicas en citometría de flujo utilizando yoduro de propidio y Anexina V. Especialmente, en un modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de ensayo de la actividad de apoptosis de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano;
- b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la inducción por el anticuerpo de la apoptosis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a); y
- c) medir el porcentaje de células apoptóticas de la línea celular según la invención de la etapa a).

En la etapa a), la línea celular según la invención (células diana) se pone en contacto con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano a caracterizar (tal como se ha descrito anteriormente), en presencia o en ausencia de un reticulante (crosslinker) (anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra el fragmento Fc, por ejemplo).

En la etapa b) se realiza una incubación (generalmente a 37 °C) durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células diana (células de la línea celular según la invención). El período de incubación puede variar entre algunas horas y aproximadamente un día, especialmente entre 1 y 24 horas, en particular durante 16 horas. El experto en la técnica sabe cómo determinar una duración óptima en función de las condiciones particulares de la prueba.

Finalmente, en la etapa c), se mide el porcentaje de células apoptóticas. Esta medición se puede realizar mediante citometría de flujo, utilizando un marcado de las células con yoduro de propidio (PI) y con Anexina V. La combinación de estos dos marcadores permite diferenciar las células vivas (Anexina-V e IP negativas) de las células en fase temprana de la apoptosis (Anexina-V positivas, PI negativas) o en la fase tardía de la apoptosis (Anexina-V positivas, PI positivas).

Un ejemplo preciso de ensayo de la actividad de apoptosis según la invención es el siguiente:

Las células diana (células de una línea celular según la invención, $2,5 \times 10^5$) se incuban con el anticuerpo anti-CD303 a caracterizar (1 µg/ml) con o sin reticulante (crosslinker) (por ejemplo, F (ab2)' de cabra anti-Fcγ de IgG humanas a 10 µg/ml) en 1 ml de RPMI 10% SVF, en placas P24 durante 24 h a 37°C. A continuación, las células se centrifugan, se lavan dos veces en PBS, se recogen en el tampón proporcionado por el kit y se incuban con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) según las recomendaciones de BD Biosciences. Las células se analizan mediante un citómetro de flujo, el porcentaje de células apoptóticas corresponde a las células marcadas con Anexina V (Anexina V y Anexina V + IP).

Caracterización de la actividad de fagocitosis

En otro modo de realización, el uso de las líneas celulares según la invención tiene como objetivo caracterizar la actividad de fagocitosis del anticuerpo anti-CD303 humano. Por tanto, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para caracterizar la actividad de inducción de la fagocitosis de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano.

Por "actividad de fagocitosis" se entiende la capacidad del anticuerpo para inducir la fagocitosis de las células diana que expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo por las células efectoras del sistema inmunitario capaces de fagocitar (monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), mediante su unión, por un lado, a las células diana por medio de sus partes variables que se unen al antígeno situado en la superficie de las células diana, y por otro lado, a las células efectoras por medio de la unión de su fragmento Fc a un receptor Fc (FcR; FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB2 en el caso de IgG) situado en la superficie de las células efectoras.

La medición de la actividad ADCC de un anticuerpo se realiza mediante técnicas convencionales. Especialmente, en un modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento para ensayar la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la línea celular según la invención con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y células efectoras capaces de fagocitar;
- b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la fagocitosis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a); y
- c) medir la tasa de fagocitosis de las células de la línea celular según la invención de la etapa a).

En la etapa a), la línea celular según la invención (células diana) se pone en contacto con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano a caracterizar (tal como se ha descrito anteriormente) y células efectoras capaces de fagocitar. En el ámbito de la caracterización de la actividad de fagocitosis, las células efectoras deben ser capaces de

fagocitar. Puede tratarse de monocitos, macrófagos o neutrófilos. En el caso de IgG, la fagocitosis se lleva a cabo a través de uno de los receptores FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB2 presente en la superficie de las células efectoras capaces de fagocitar. Al tener el receptor FcγRI alta afinidad, a diferencia de los receptores FcγRIIA y FcγRIIB2, se puede medir la actividad de fagocitosis a través de FcγRIIA y FcγRIIB2 usando IgG polivalentes, como se ha descrito anteriormente para ADCC.

Las células diana (células que expresan en su superficie el antígeno CD303 humano reconocido por el anticuerpo a ensayar, en este caso las células de la línea celular según la invención) pueden haberse marcado previamente intracelularmente con un marcador que permite la etapa c) de medición del número de células diana eficazmente fagocitadas. Se puede usar cualquier marcador adecuado, tal como un marcador radiactivo, fluorescente, luminiscente o cromogénico.

Las células diana (células que expresan en su superficie el antígeno CD303 humano reconocido por el anticuerpo a ensayar, en este caso las células de la línea celular según la invención) y las células efectoras están presentes en una relación efectora/diana (E/C) próxima a las condiciones fisiológicas *in vivo*.

Se realiza generalmente una curva dosis/respuesta para la actividad de fagocitosis. Para ello, se ponen en contacto cantidades crecientes de anticuerpos con células diana y células efectoras en pocillos separados y se mide la actividad de fagocitosis a diferentes concentraciones de anticuerpos. Cada punto se realiza generalmente en varios ejemplares (especialmente por duplicado o triplicado).

También se realiza un control positivo: fagocitosis natural (NP), obtenida poniendo en contacto las células diana únicamente con las células efectoras (sin anticuerpos).

En la etapa b), se realiza una incubación (generalmente a 37°C) durante un tiempo adecuado para permitir la fagocitosis de las células diana (células de la línea celular según la invención). El período de incubación puede variar entre algunas horas y aproximadamente un día, especialmente entre 1 y 24 horas, en particular durante 4 a 24 horas. El experto en la técnica sabe cómo determinar una duración óptima en función de las condiciones particulares de la prueba.

Finalmente, en la etapa c), se mide la tasa de fagocitosis de las células diana (células de la línea celular según la invención). Esto se realiza generalmente eliminando por lavado las células diana no fagocitadas (siendo generalmente adherentes las células efectoras capaces de fagocitar) y midiendo la cantidad de células diana previamente marcadas presentes en los fagocitos.

El porcentaje de fagocitosis o índice de fagocitosis se puede entonces calcular según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fagocitosis} = (\% \text{ de células efectoras que contienen al menos una célula diana}) \times (\text{número medio de células diana por célula efectora que contiene células diana}).$$

Los resultados (% de fagocitosis) se expresan en función del factor de dilución del anticuerpo. Para cada anticuerpo, se puede calcular un valor de "50% de actividad" o "EC50", que corresponde al factor de dilución del anticuerpo necesario para inducir el 50% del valor de meseta obtenido para este anticuerpo.

Comparación de la afinidad de varios anticuerpos anti-CD303 para el antígeno CD303 humano

En otro modo de realización, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para comparar la afinidad de unión de varios anticuerpos anti-CD303 con el antígeno CD303 humano.

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-CD303 al antígeno CD303 humano se puede medir usando una línea celular según la invención mediante cualquier tecnología conocida por el experto en la técnica.

Especialmente, la fijación de los anticuerpos anti-CD303 a ensayar sobre el CD303 humano expresado por la línea celular según la invención puede estudiarse mediante citometría de flujo. Para ello, las células de la línea celular según la invención se incuban, en primer lugar, durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo (anti-CD303 o control negativo) a diferentes concentraciones (0-40 µg/ml, concentración final). Después de lavar con el diluyente, los anticuerpos se visualizan mediante la adición de un fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón acoplado a ficoeritrina (PE) (100 µl a una dilución de 1:100 en el diluyente) durante 45 minutos a 4°C. Después, las células se lavan y se analizan mediante citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter).

Los resultados se expresan en forma de curva dosis-respuesta, detallándose las concentraciones en el eje X y las medias de intensidad de fluorescencia (MFI) en el eje Y.

Los valores de meseta (Bmax, media de intensidad de fluorescencia máxima) se pueden estimar después de la modelización de las curvas, por ejemplo, mediante el programa GraphPad PRISM®, y comparar entre los diferentes anticuerpos anti-CD303 a ensayar. También se puede calcular un valor denominado EC₅₀, que representa la cantidad

de anticuerpo necesaria para alcanzar el 50% del valor de Bmax. Se pueden comparar los valores EC₅₀ de los diferentes anticuerpos a ensayar.

Comparación de los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por dos anticuerpos anti-CD303

5 En otro modo de realización, la invención se refiere al uso de la línea celular según la invención para comparar los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por varios anticuerpos anti-CD303.

10 Con el fin de comparar los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por dos anticuerpos anti-CD303, los anticuerpos a ensayar pueden competir por la unión a una línea celular según la invención con diferentes anticuerpos anti-CD303 cuyo epítopo es conocido. Especialmente, uno de los dos anticuerpos a ensayar es preferentemente portador de un marcador de detección y se pone en contacto con una línea celular según la invención en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes del otro anticuerpo anti-CD303 no marcado. A continuación, se mide la intensidad del marcado de las células de la línea celular según la invención. Si los epítomos reconocidos por los dos anticuerpos son idénticos o se solapan, se observa una competencia entre los dos anticuerpos por unirse a la línea celular según la invención, es decir, que la intensidad del marcado de las células de la línea celular según la invención disminuye cuando aumenta la concentración de anticuerpo no marcado.

20 Si se conoce el epítopo del antígeno CD303 humano reconocido por uno de los dos anticuerpos anti-CD303, esto puede permitir caracterizar el epítopo reconocido por el otro anticuerpo anti-CD303.

Caracterización de las capacidades funcionales de las células efectoras de un sujeto humano

25 La línea celular según la invención puede utilizarse también para caracterizar las capacidades funcionales (especialmente las capacidades de tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis y fagocitosis) de las células efectoras de un sujeto humano, en particular un sujeto humano que padece BPDCN o una enfermedad autoinmune.

Capacidades funcionales a caracterizar

30 Las capacidades funcionales susceptibles de caracterizarse son las mismas que las anteriores, especialmente las capacidades de tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis y fagocitosis.

35 Los métodos de prueba son los mismos que los descritos anteriormente para la caracterización de anticuerpos anti-CD303, con la excepción de que se usa el mismo anticuerpo y que los controles usados son unos controles de células efectoras cuyas capacidades funcionales son conocidas.

Células efectoras a caracterizar

40 Las células efectoras a caracterizar pueden, especialmente, haberse obtenido previamente de sujetos humanos que padecen BPDCN o una enfermedad autoinmune.

Las células efectoras de sangre periférica se pueden usar para la caracterización, en forma de PBMC, o de células efectoras purificadas, tales como monocitos, macrófagos, linfocitos T o células NK.

45 *Kits de caracterización de anticuerpos anti-CD303*

Según otro objeto, la invención consiste en un kit de caracterización de anticuerpos anti-CD303 que comprenden la línea celular según la invención, y ventajosamente al menos un reactivo seleccionado entre células efectoras, IgG polivalentes y anticuerpos anti-CD303 de referencia.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación y caracterización de una línea celular Jurkat que expresa de manera estable CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano

55 Materiales y métodos

Células y condiciones de cultivo

60 La línea celular Jurkat de cadena Fc y (línea Jurkat Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™) transfectada de manera estable por un vector de expresión (pcDNA4/TO) de la cadena gamma del receptor FcεRI humano) se cultivó en medio RPMI 1640 con glutamina suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SVF) a 37°C bajo un 7% de CO₂ en el aire. Las células se sembraron a 0,5 x 10⁵ células/ml tres días antes de Nucleofection®.

65 *Construcción del vector*

ES 2 819 902 T3

El ADNc de longitud completa que codifica el antígeno CD303 humano (GenBank/EMBL/DDBL, AF293615.1) se subclonó en el vector pcDNA3.1 (-) (véase mapa de este vector en la Figura 1).

Después de la adición de los sitios de restricción BamHI y HindIII, de la secuencia de Kozak y de un segundo codón STOP, la secuencia codificante se sintetiza en MWG.

El vector pcDNA3.1 fue secuenciado por MWG con el cebador BGHpAPERC6-3' antes de empezar el estudio a fin de determinar si el vector es (+) o (-) ya que los sitios de clonación son diferentes en estos dos vectores. La secuenciación ha demostrado que el vector es pcDNA3.1 (-).

La secuencia codificante de CD303 y los cebadores CD303-5' y CD303-3' se sintetizan en MWG. Se realiza una digestión doble con BamHI y Hind III sobre el vector MWG que comprende la secuencia codificante de CD303 del vector pcDNA3.1 (-). La digestión se verifica sobre gel y las secuencias se purifican mediante Nucleospin extract II. Se inserta CD303 en el vector pcDNA3.1 (-) por ligación, después se transforma en *E. coli*. Se realiza un cribado por PCR de 7 colonias bacterianas usando el cebador sentido CD303-5': 5'-ACATTCAGTGCATGTACCTCAGAAGTC-3'; y el cebador antisentido BGHpAPERC6-3': 5'-CATGCCTGCTATTGTCTTCCCA-3'. El programa de PCR utilizado comprende 30 ciclos que comprenden especialmente las etapas de hibridación (52°C), de elongación (30 segundos a 72°C) y de desnaturalización (95°C). 6 colonias de 7 contienen el inserto CD303 (producto de PCR de 295 pb). A partir de estas 6 colonias se preparan 4 gliceroles madre, y se purifican 4 cultivos bacterianos para recuperar el vector pcDNA3.1 (-) que porta el inserto CD303. Se realiza una digestión de control con las enzimas BamHI y HindIII para asegurar la presencia del inserto CD303.

La secuencia de los insertos CD303 presentes en los vectores pcDNA3.1 (-) purificados por miniprep se confirma mediante secuenciación gracias a los cebadores CD303-5' y CD303-3' (5'-AGACCTTCAACTGGAACCCAGAG-3').

A continuación, se purifican los vectores mediante Maxiprep Endofree y se validan mediante secuenciación con los cebadores CD303-5' y CD303-3'.

Los vectores se linealizan después mediante Scal y se precipitan antes de ser recogidos en tampón TE a 1 µg/ml.

Transfección de células Jurkat de cadena Fc γ

Las transfecciones se realizaron según los procedimientos establecidos de los sistemas de transfección Amaxa (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania). Para nucleofección, 2 x 10⁶ y 3 µg de vector pcDNA3.1 linealizado (-) CD303 se pusieron en suspensión en 100 µl de disolución de Nucleofector (kits Nucleofector™ para Jurkat, Amaxa) según el programa X-001. Como control, se utilizó 1 µg de ADN plasmídico EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (pmaxGFP, Amaxa) con el mismo protocolo de nucleofección.

Después de la transfección, las células se esparcieron en placas de 6 pocillos sin antibiótico con medio de cultivo. El medio selectivo se renovó parcialmente (aproximadamente medio volumen) dos veces por semana con un intervalo de 3-4 días.

Después de 24h, se recogieron las células transfectadas con pmaxGFP para medirlas. Las eficiencias de transfección se determinaron mediante FACS después de la transfección de pmax-GFP (Lonza, Allendale, NJ, USA).

Después de 48h de cultivo, las células transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo y las células que expresan CD303 en su superficie se purificaron mediante clasificación celular mediante FACS.

Clasificación celular activada por fluorescencia

Brevemente, el conjunto de las células transfectadas se marcó con anticuerpos anti-CD303 marcados con PE (Miltenyi Biotec). Unos anticuerpos monoclonales de ratones del mismo isotipo PE (ficoeritrina) sirvieron como controles. Las células marcadas por fluorescencia se analizaron en un clasificador celular FACS EPICS ALTRA (Beckman). La selección por genética se inició 24 horas después de la clasificación celular, aplicando 1 mg/ml de G418 (Sigma) en un medio de cultivo.

Clonación por dilución limitante

A continuación, las células se inocularon a 1.10⁵ células/ml durante 48h antes de la clonación. El día de la clonación, contaron las células, la viabilidad debe ser superior al 80% para continuar. Las células se resuspendieron en RPMI + un 10% de SVF (2 células/ml) y se sembraron en placas de 96 pocillos (200 µl/pocillo correspondiente a 0,4 células/pocillo). Las células se incubaron a 37°C, 7% de CO₂ durante 10 a 12 días.

El medio se renovó en parte (aproximadamente la mitad del volumen) dos veces por semana con un intervalo de 3-4 días.

Determinación del número de moléculas de CD303 por célula

La determinación del número de moléculas de CD303 por célula de uno de los clones Jurkat de cadena Fc gamma-CD303 se realiza mediante citometría de flujo, con la ayuda del kit Qifikit comercializado por Dako, y del anticuerpo murino anti-CD303 AC144.

Las células de uno de los clones Jurkat de cadena Fc Gamma-CD303 y los anticuerpos se preparan en un diluyente (PBS + 1% de FCS).

Se incuban 1×10^5 células a 4°C durante 30 minutos con 100 µl de anticuerpos (anti-CD303 o control negativo) a diferentes concentraciones (0-40 µg/ml, concentración final).

Después de lavar con el diluyente, los anticuerpos se visualizan por la adición de un fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón acoplado con ficoeritrina (PE) (100 µl a una dilución de 1:100 en el diluyente) durante 45 minutos a 4°C. Las células se lavan después y se analizan mediante citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter).

Resultados

Selección por FACS de células Jurkat de cadena Fc y transfectadas por CD303

Antes de la clasificación celular, casi el 0,4% de las células expresaban CD303 (datos no mostrados).

Se aislaron las células CD303 positivas mediante FACS (20 767 células, conjunto 008-2) y se sembraron en un medio RPMI + un 10% de FCS. Desafortunadamente, estas células no crecen en estas condiciones de cultivo.

Las células CD303 negativas se sembraron bajo selección con geneticina (Día 3). El día 25, el 35% de estas células expresaban CD303. Después de una segunda clasificación celular, casi el 73% de las células eran positivas para CD303 y después de otros 18 días bajo selección con geneticina, más del 88% de las células expresaban CD303 (Figura 2).

Al día 44, después de una tercera clasificación celular, casi el 93% de las células expresaban CD303 (Figura 3).

Estabilidad de la expresión de CD303: después de dos meses de cultivo bajo selección con geneticina, más del 77% de las células aún expresaban CD303 (Figura 4).

Clonación por dilución limitante de células CD303+

Además, se realizó una clonación por dilución limitante de las células Jurkat de cadena Fc y transfectantes estables que expresan CD303.

Se aislaron 27 clones y se ensayaron mediante coloración con un anticuerpo anti-CD303-PE. Sólo se seleccionaron y descongelaron cuatro clones, más del 80% de las células expresaban CD303 (Figura 5).

Determinación del número de moléculas CD303 por célula.

Uno de los clones se caracterizó después con respecto al número de moléculas de CD303 por célula. Los resultados muestran un número de moléculas CD303 por célula de 28325 +/- 5405.

Conclusión

Después de la transfección por un vector pcDNA3.1 (-) CD303, la selección de la geneticina y la clasificación celular activada por fluorescencia, ahora está disponible un conjunto estable de células Jurkat de cadena Fc y CD303+ (más del 80% de células positivas), y representa una herramienta interesante para la caracterización *in vitro* de anticuerpos anti-CD303.

Ejemplo 2. Transfección de células pDC para la sobreexpresión de CD303

La transfección de células CAL-1 (pDC) para sobreexpresar CD303 se realiza con el kit Amaxa Human Dendritic Cell Nucleofector.

El día anterior a la transfección, las células se subcultivan a $2 \cdot 10^5$ células/ml. El día de la transfección, las células CAL-1 tienen una densidad celular de $4,6 \cdot 10^5$ células/ml y un 85% de viabilidad.

El día de la transfección:

ES 2 819 902 T3

- * el medio EMS + un 10% de FCS (suero fetal de ternera) se precalienta durante 1 hora a 37°C (1 matraz F25 que contiene 7,5 ml y 2 pocillos de placa P6 que contienen 1,5 ml),
- 5 * el "suplemento" disponible en el kit (135 µl) se añade a la disolución "Nucleofector" (615 µl).
- * se centrifugan $7 \cdot 10^6$ células durante 10 minutos a 200 g ($1 \cdot 10^6$ células/cubeta).
- * se recoge entonces el residuo en 700 µl de disolución de Nucleofector y se distribuye a 100 µl mediante tubo Eppendorf.
- 10 * se añaden 3 µl (3 µg) de vector pcDNA3.1-CD303, 4 µl (2 µg) de vector pmax-GFP o ningún vector (control negativo) mediante tubo Eppendorf.
- * la suspensión celular se transfiere a las cubetas y se aplica el programa U-002.
- 15 * se añaden 500 µl de medio precalentado a la cubeta y la suspensión celular se transfiere suavemente en la F25 o las P6 que contienen el medio:
- 20 - se recogen 5 cubetas que comprenden pcDNA3.1-CD303 en F25 en 10 ml de medio;
- se recoge 1 cubeta que comprende Pmax-GFP en P6 en 2 ml de medio;
- se recoge 1 cubeta que comprende T- en P6 en 2 ml de medio.
- 25 * después, se dejan incubar las cubetas a 37°C con 7% de CO₂.
- Desde D+1 hasta D+51:
- 30 * a D+1: se realizan unas mediciones de GFP por citometría y microscopía de fluorescencia para estimar la eficiencia de la transfección. Las medidas citométricas revelan un 49% de las células transfectadas y las de microscopía un 43% de las células transfectadas.
- * a D+3: se recuentan las células y se recoge el residuo a $5 \cdot 10^5$ células/ml en medio de selección (EMS + un 10% de FCS + 1 g/l de G418).
- 35 * a D+6: se recuentan las células y se recoge el residuo a $4 \cdot 10^5$ células/ml en medio de selección (EMS + 10% de FCS + 1 g/l de G418).
- 40 ◦ Cal-1 transfectada CD303: $8,1 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 49%
- Cal-1 control negativo: $2,6 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 42,6%
- * a D+8: se recuentan las células y se coloca en P24 una parte de las células (1 ml/pocillo) y el resto en F150 (56 ml)
- 45 ◦ Cal-1 transfectada CD303: $0,22 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 3%
- Cal-1 control negativo: $0,1 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad del 1,5%
- * a D+10: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- 50 ◦ F150: $0,08 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 1,3%. Centrifugación y recogida del residuo en 65 ml para no superar $5 \cdot 10^5$ de células muertas/ml
- P24: Cambio de la mitad del medio
- 55 ◦ Control negativo: $0,0 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 0% → parada.
- * a D+13: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- 60 ◦ F150: $0,04 \cdot 10^5$ células/ml y 0,7% de viabilidad. Centrifugación y recogida del residuo en 70 ml para no superar $5 \cdot 10^5$ de células muertas/ml
- P24: Cambio de la mitad del medio
- 65 * a D + 17: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303

ES 2 819 902 T3

- F150: $0,04 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 1,0%. Centrifugación y recogida del residuo en 56 ml para no superar $5 \cdot 10^5$ células muertas/ml
 - P24: Cambio de la mitad del medio
- 5 * a D+20: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- F150: $0,002 \cdot 10^5$ células/ml y viabilidad al 0,5%. → parada.
- 10 ◦ P24: se recuenta un pocillo: $16,4 \cdot 10^5$ célula/ml y un 53,8% de viabilidad, P24 transferida en 3 F75 (8 pocillos de P24/F75 en 30 ml final).
- * a D+22: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- 15 ◦ F75: $12,8 \cdot 10^5$ células/ml y un 85% de viabilidad.
- marcado del conjunto con el anti-CD303-PE. Sólo una pequeña proporción de la población celular expresa CD303 en un nivel alto (véase la Figura 6).
- 20 ◦ congelación de 8 criotubos en nitrógeno líquido.
- subcultivo de $3 \cdot 10^5$ células/ml en F75
- * a D+24: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- 25 ◦ F75: $19,9 \cdot 10^5$ células/ml y un 95% de viabilidad. Subcultivo de $2 \cdot 10^5$ células/ml en F75
- Clonación a 40 células/P96 en EMS + un 10% de SVF + 0,5 g/l de G418 y realización de 5 placas de clonación.
- 30 * de D+28 hasta D+37: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- F75: subcultivo de $2 \cdot 10^5$ células/ml en F75 3x/semana
 - clonación: cambio de mitad del medio 1x/semana.
- 35 * de D+38 hasta D+50: se recuentan las células Cal-1 transfectadas CD303
- F75: subcultivo de $2 \cdot 10^5$ células/ml en F75 3x/semana
- 40 ◦ clonación: paso de los clones en P24 y después en P6 para el cribado de la expresión de CD303 mediante citometría.
- Cribado de 30 clones y conservación de 2 clones positivos, NF-3C8 y NF-5G9 (véase la Figura 7).
- 45 * a D+51: congelación de 8 criotubos de los clones NF-3C8 y NF-5G9 y mantenimiento de los clones en cultivo a $0,5 \cdot 10^5$ células/ml, subcultivo 2x/semana.
- Las células de la línea CAL-1 y los dos clones NF-3C8 y NF-5G9 se caracterizaron después con respecto al número de moléculas CD303 por célula, mediante citometría de flujo, con la ayuda del kit Qifikit comercializado por Dako, y del anticuerpo murino anti-CD303 AC144, según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.
- 50 Los resultados muestran un número de moléculas CD303 por célula de 3000-6000 (es decir alrededor de 4500 en promedio) para las células de la línea CAL-1 y de 40000 a 50000 (es decir alrededor de 45000 en promedio) moléculas CD303 por célula para los dos clones. Por lo tanto, los dos clones NF-3C8 y NF-5G9 tienen una fuerte expresión de superficie de CD303 con respecto a la línea celular de origen CAL-1, con un factor de amplificación de aproximadamente 10 (es decir, un aumento de aproximadamente el 900% con respecto a la línea celular CAL-1 de origen).
- 55
- 60 *Ejemplo 3. Estudio de estabilidad de los clones NF-3C8 y NF-5G9 en presencia y en ausencia de G418 durante 3 meses.*
- Materiales y métodos
- 65 Las células se subcultivan 2x/semana a $0,5 \cdot 10^5$ células/ml en F25 (10 ml) en medio EMS + 10% de FCS +/- G418 0,5 g/l.

La expresión de CD303 se controla cada 2 semanas mediante citometría.

Se realiza el marcado sobre hielo utilizando el anti-CD303-PE (AC144) (Miltenyi biotec ref. 130-090-511) diluido a 1/10 en PBS + un 1% de SVF.

5

Resultados

Los resultados de los marcados en citometría se presentan en las Figuras 8 y 9.

10 Los valores de MFI varían ligeramente según las pruebas, pero no se observa pérdida de expresión de CD303 después de 12 semanas de cultivo en ausencia de G418. Por lo tanto, la expresión de CD303 es estable para los 2 clones ensayados.

15 *Ejemplo 4. Caracterización de anticuerpos quiméricos anti-CD303 con la ayuda de las células Jurkat-CD303 o de clones NF-3C8 y NF-5G9*

Materiales y métodos

Anticuerpos

20 Se ensayaron cinco anticuerpos quiméricos anti (CD303 humano), denominados 122A2, 102E9, 114D11, 104C12 y 104E10. También se utilizaron un anticuerpo de control dirigido contra otro antígeno y un anticuerpo humanizado anti (CD303 humano) denominado B1IB059.

25 *Prueba de unión a CD303*

Se preparan unas células Jurkat de cadena Fc Gamma-CD303 o unas células NF-3C8 y NF-5G9, por un lado, y los anticuerpos, por otro lado, en un diluyente (PBS + un 1% de SVF).

30 Se incuban 1×10^5 células a 4°C durante 30 minutos con 100 µl de anticuerpos (anti-CD303 o control negativo) a diferentes concentraciones (0-40 µg/ml, concentración final).

35 Después de lavar con el diluyente, los anticuerpos se visualizan por adición de un fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón acoplado con ficoeritrina (PE) (100 µl a una dilución de 1:100 en el diluyente) durante 45 minutos a 4°C. Después, las células se lavan y se analizan mediante citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter).

Prueba ADCC a través de CD16a

40 Se incuban unas células Jurkat de cadena Fc Gamma-CD303 (35000 células/pocillo) en una placa de fondo plano de 96 pocillos con células NK y concentraciones crecientes de anticuerpos anti-CD303 durante 4 horas a 37°C. Después de la incubación, se recoge el sobrenadante. La lisis de las células diana inducida por los anticuerpos anti-CD303 se mide cromogénicamente cuantificando la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas (Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH).

45 El porcentaje de lisis se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = [(ER - SR) / (100 - SR)] - [(NC - SR) / (100 - SR)]$$

50 En la que ER y SR representan respectivamente las liberaciones experimentales (ER) y espontánea (SR) de LDH, y NC representa la citotoxicidad natural de las células NK. Los resultados (% de lisis) se expresan en función del factor de dilución del anticuerpo. Para cada anticuerpo, el valor de "50% de actividad" corresponde al factor de dilución del anticuerpo necesario para inducir un 50% del valor de meseta obtenido para este anticuerpo. Este valor se calculó con el programa PRISM.

55 Resultados

Prueba de unión a CD303

60 Los resultados se presentan en la Figura 10, y muestran que es posible distinguir diferencias en la unión al antígeno CD303 humano usando el clon NF-3C8 o NF-5G9 alternativamente.

Prueba ADCC

65 La actividad ADCC a través de CD16a obtenida con los anticuerpos quiméricos anti-CD303 122A2 y 114D1 o con un anticuerpo control, en presencia de la línea CAL-1 no transfectada por un vector de expresión del antígeno CD303

humano se representa en la Figura 11A. La baja actividad específica ADCC (aproximadamente un 10%) observada con la línea celular CAL-1 se debe probablemente a un número bajo de sitios CD303 (entre 3000 y 6000 sitios).

5 La actividad ADCC a través de CD16a obtenida con los anticuerpos quiméricos anti-CD303 122A2 y ch.102E9, con el anticuerpo humanizado anti-CD303 BIIB059 o con un anticuerpo control, en presencia de la línea CAL-1 transfectada por un vector de expresión del antígeno CD303 humano que expresa 40000 a 50000 moléculas de antígeno CD303 humano en su superficie (clon NF-3C8) se representa en la Figura 11B, y en la tabla 1 siguiente.

	Control	ch. 122A2	ch.102E9	BIIB059
Emax (% de lisis)	na	39,94	40,19	29,30
EC50 (ng/ml)	na	0,04	0,05	1,68

10 Tabla 1. Actividad ADCC a través de CD16a obtenida con los anticuerpos quiméricos anti-CD303 122A2 y ch.102E9, con el anticuerpo humanizado anti-CD303 BIIB059 o con un anticuerpo control. Emax: % de lisis máxima obtenida en la meseta con una alta concentración de anticuerpos. CE50: concentración de anticuerpos que permite obtener un % de lisis que corresponde al 50% de la lisis máxima.

15 Claramente, el clon NF-3C8 permite, mucho mejor que la línea CAL-1 no transfectada, poner en evidencia la respuesta ADCC a través de CD16a inducida por los diversos anticuerpos anti-CD303.

20 La actividad ADCC a través CD16a inducida por los anticuerpos quiméricos anti-CD303 122A2 y 114D1 es aproximadamente 40 veces mayor que la inducida por el anticuerpo humanizado anti-CD303 BIIB059.

Conclusiones

25 Los datos presentados anteriormente muestran claramente la ventaja de las líneas según la invención para caracterizar y discriminar unos anticuerpos anti-CD303 con fines terapéuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almagro *et al.* *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, 1 de enero de 2008.

30 Cardarelli *et al.* *Cancer Immunol Immunother.* 2010. 59. 257-265,
 Cardarelli *et al.* *Clin Cancer Res* 28 de abril de 2009; 15:3376-3383.

Dall'Acqua *et al.* 2002, *J Immunol.*; 169:5171 -80.

35 Dall'Acqua *et al.* 2006, *J. Biol. Chem.*;281: 23514-24. (a).
 Dall'Acqua *et al.* *J Immunol* 2006; 177:1129-1138. (b).

40 Edelman, G.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969).
 EP1176195A1
 Forthal *et al.*, *J Immunol* 2010;185:6876-6882.

45 Herbst R. *et al.* *J Pharmacol Exp Ther.* Octubre de 2010;335(1):213-22.
 Hinton *et al.* 2004, *J Biol Chem.*;279:6213-6.

50 Idusogie EE *et al.* *J Immunol.* 2001; 166:2571-5.
 Imai-Nishiya *et al.*, *BMC Biotechnology* 2007, 7:84.
 Jones *et al.* *Nature*, 321: 522-525, 1986.

55 JP 5011520
 Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

60 Kanda Y *et al.*, *Journal of Biotechnology* 130 (2007) 300-310.
 Lazar, G. A., *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11): 4005-10.

- Maeda T *et al.*, *Int J Hematol.* 2005 Feb; 81(2):148-54
- 5 Moore GL. *et al.* *mAbs* 2:2, 181-189; Marzo/abril, 2010.
- Mori K, *et al.* *Biotechnol Bioeng.* 30 de diciembre de 2004; 88(7):901-8.
- Olivier S. *et al.* *MAbs.* 2010 Jul-Ago; 2(4): 405-415.
- 10 Riechmann *et al.* *Nature*, 332: 323-327, 1988.
- Shields RL, *et al.* *J Biol Chem.* 2 de marzo de 2001; 276(9):6591-604.
- Shields RL, *et al.* *J Biol Chem.* 26 de julio de 2002; 277(30):26733-40.
- 15 Shinkawa T, *et al.* *J Biol Chem.* 31 de enero de 2003; 278(5):3466-73.
- Suzuki *et al.* *Clin Cancer Res* 15 de marzo de 2007; 13:1875-1882.
- 20 Umana *et al.* *Nat Biotechnol.* Febrero de 1999; 17(2):176-80.
- Verhoeyen *et al.* *Science*, 239: 1534-1536, 1988.
- 25 WO00/42072,
- WO00/42072,
- WO01/77181
- 30 WO02/060919,
- WO2004/029207,
- WO2004/063351,
- 35 WO2004/074455,
- WO2008/028686
- 40 WO2010/045193,
- WO2010/106180
- WO2012/041768
- 45 WO2012/080642,
- WO99/51642,
- 50 Yamane-Ohnuki N. *et al.* *Biotechnol Bioeng.* 5 de septiembre de 2004;87(5):614-22.

REIVINDICACIONES

1. Línea celular que expresa la cadena gamma del receptor FcεRI y el antígeno CD303 humano, caracterizada por que dicha línea celular se transfecta de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y presenta una fuerte expresión de CD303 humano en su superficie, caracterizada por que dicha línea celular tiene al menos 10000 moléculas CD303 humanas por célula y por que dicha línea celular es:
- 5
- a) una línea celular de células dendríticas plasmocitoides humanas (pDC) transfectadas de manera estable por un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano; o
- 10
- b) una línea celular de linfocitos humanos, transfectada de forma estable por un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o por dos vectores de expresión que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano.
- 15
2. Línea celular según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha línea celular es una línea transfectada de manera estable por un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano, seleccionada de la línea CAL-1 o una línea pDC humana obtenida a partir de células de neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN) de un paciente humano mediante un método que comprende las siguientes etapas:
- 20
- las células BPDCN malignas primarias se obtienen de la sangre periférica de un paciente diagnosticado de padecer BPDCN según la clasificación de la OMS; y
 - las células supervivientes después de un cultivo a largo plazo se clonan para obtener una línea celular de larga duración en cultivo.
- 25
3. Línea celular según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha línea celular es una línea Jurkat, transfectada de manera estable por un vector de expresión que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno CD303 humano y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la cadena gamma del receptor FcεRI humano, o por dos vectores de expresión que comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica respectivamente el antígeno CD303 humano y la cadena gamma del receptor FcεRI humano.
- 30
4. Línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha línea celular presenta en su superficie entre 20000 y 60000, preferiblemente entre 25000 y 50000, moléculas de CD303 humano por célula.
- 35
5. Uso de la línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para caracterizar una actividad funcional de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, preferiblemente una actividad de tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis o fagocitosis, o para comparar la afinidad de unión de varios anticuerpos anti-CD303 al antígeno CD303 humano o los epítomos del antígeno CD303 humano reconocidos por varios anticuerpos anti-CD303.
- 40
6. Uso de la línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para caracterizar las capacidades funcionales, especialmente las capacidades de tipo ADCC, CDC, secreción de citoquinas, apoptosis y fagocitosis, de las células efectoras de un sujeto humano, en particular un sujeto humano que padece BPDCN o una enfermedad autoinmune.
- 45
7. Procedimiento de prueba de la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano, que comprende las siguientes etapas:
- 50
- a) poner en contacto la línea celular según las reivindicaciones 1 a 4 con un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD303 humano y células efectoras;
- 55
- b) incubar durante un tiempo adecuado para permitir la lisis de las células de la línea celular según las reivindicaciones 1 a 4 de la etapa a); y
- 60
- c) medir el grado de lisis de las células de la línea celular según las reivindicaciones 1 a 4 de la etapa a).
8. Kit de caracterización de anticuerpos anti-CD303 que comprende la línea celular según las reivindicaciones 1 a 4, y ventajosamente al menos un agente reactivo seleccionado entre células efectoras, IgG polivalente y anticuerpos anti-CD303 de referencia.
- 65

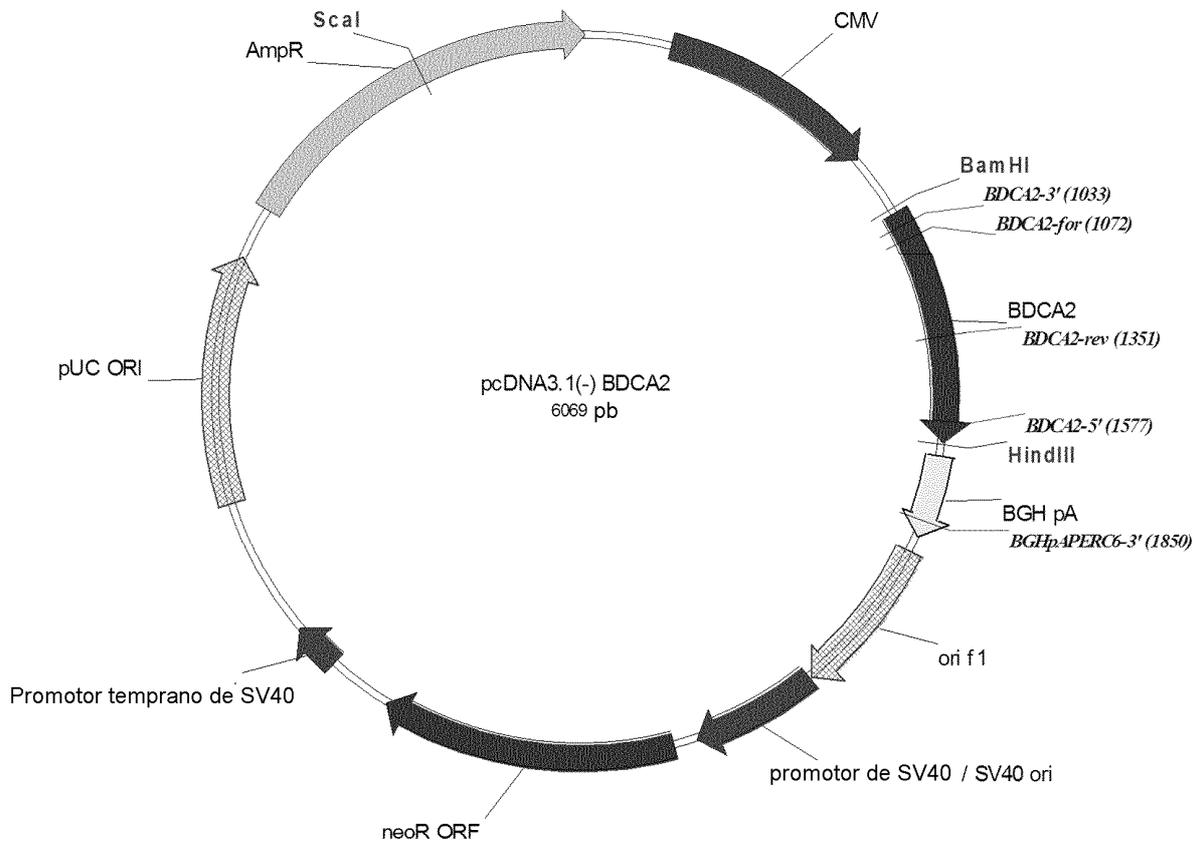


Figura 1

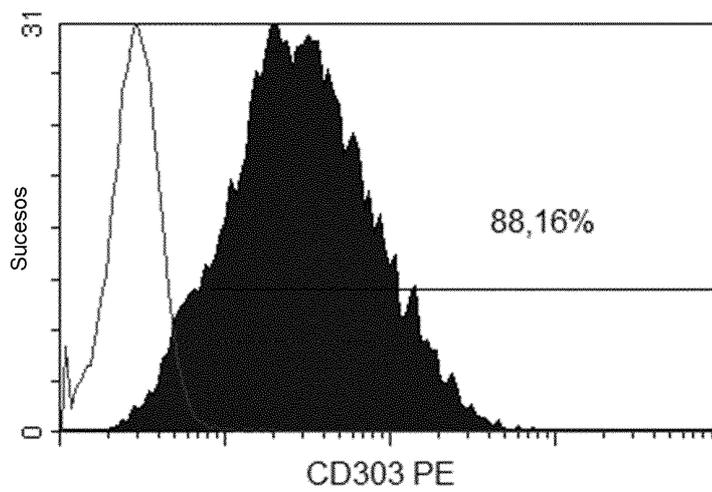


Figura 2

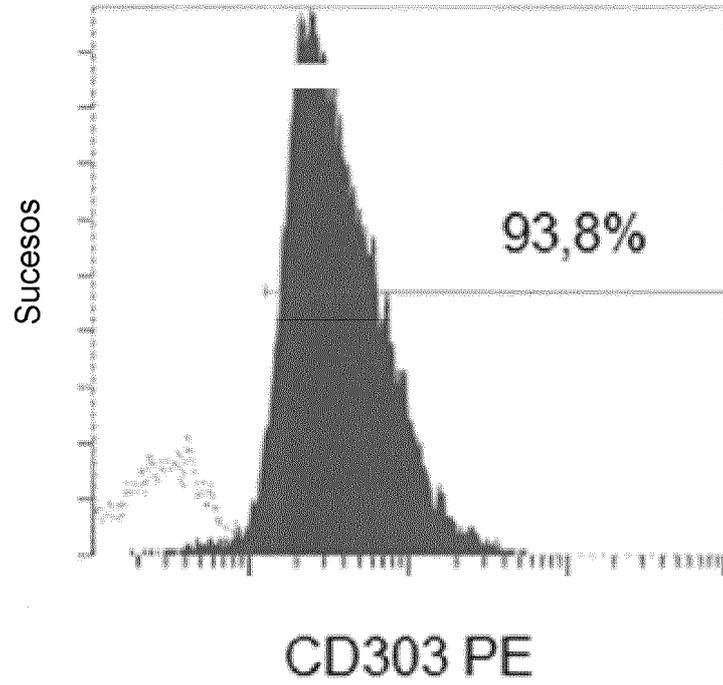


Figura 3

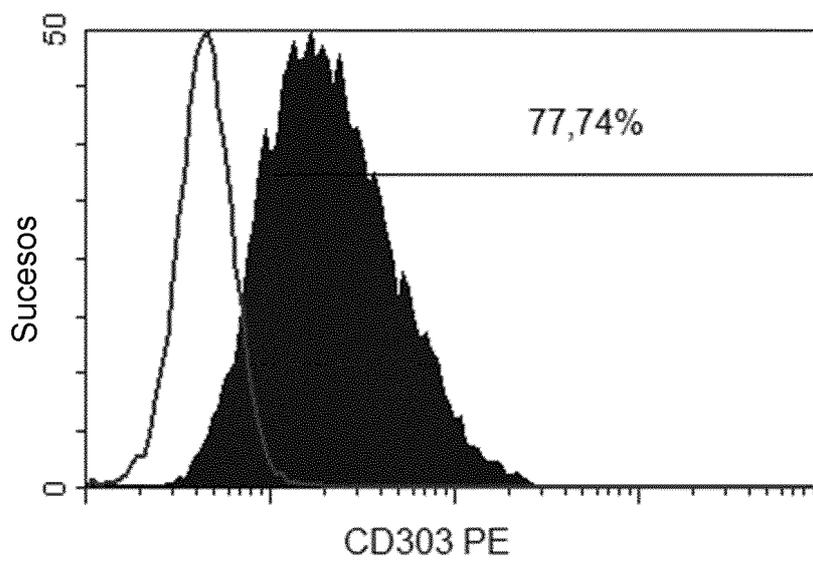


Figura 4

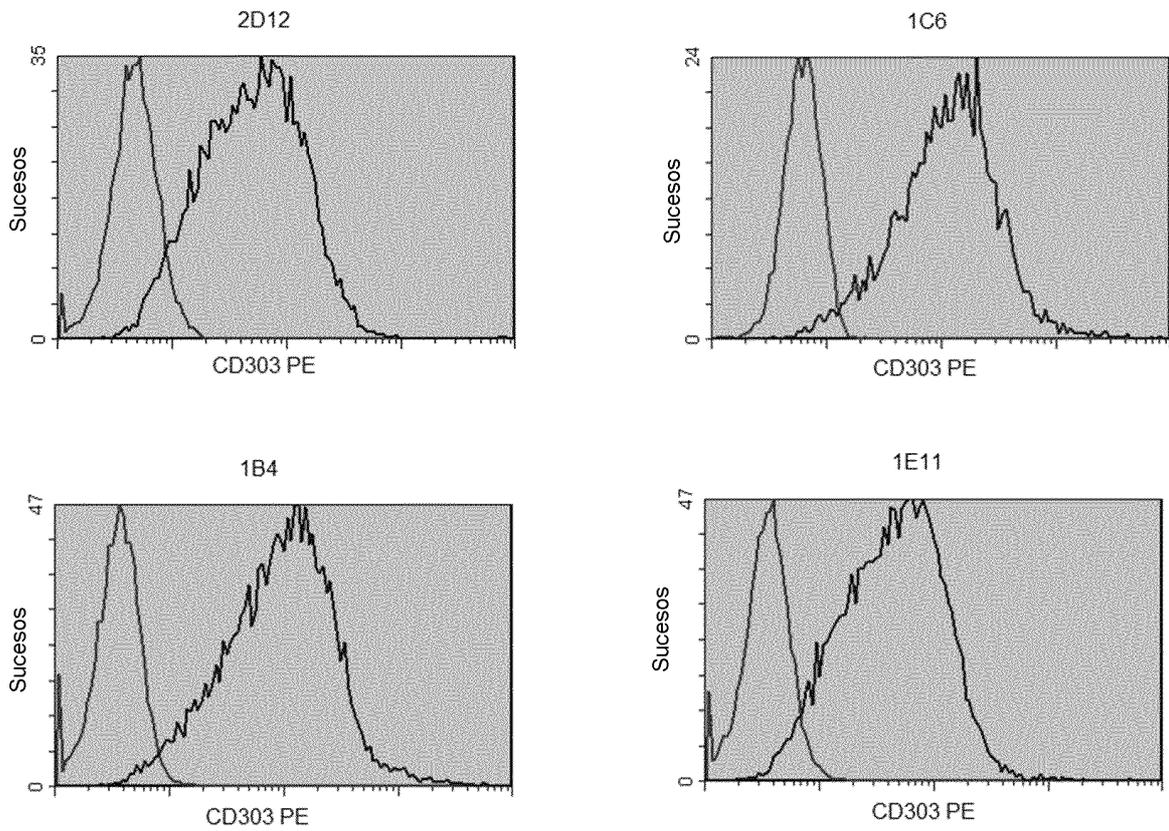


Figura 5

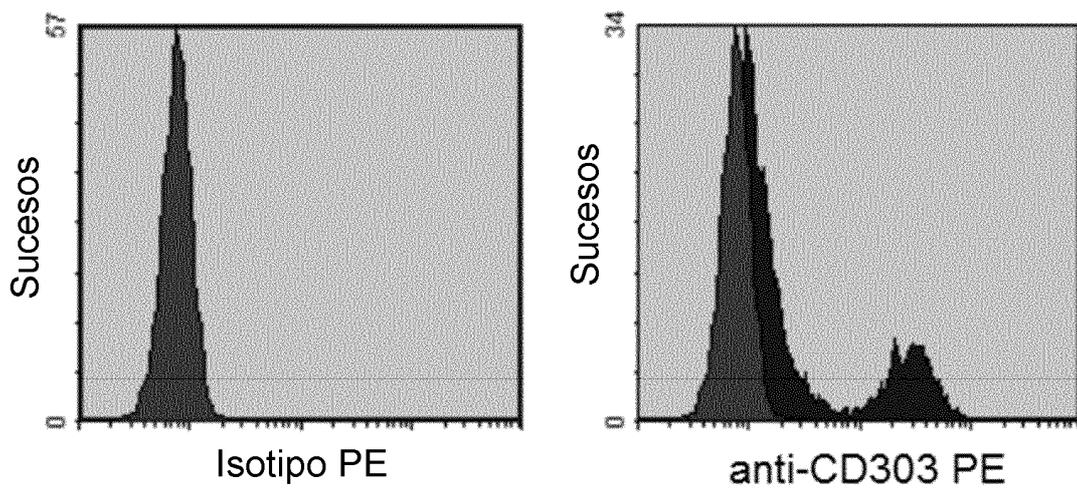
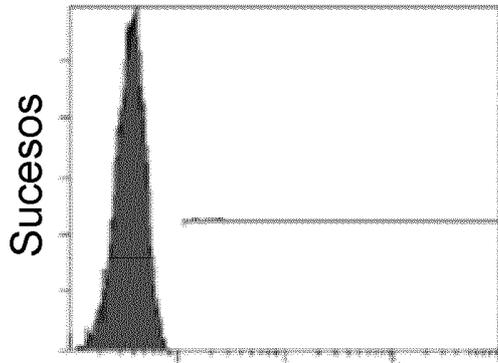
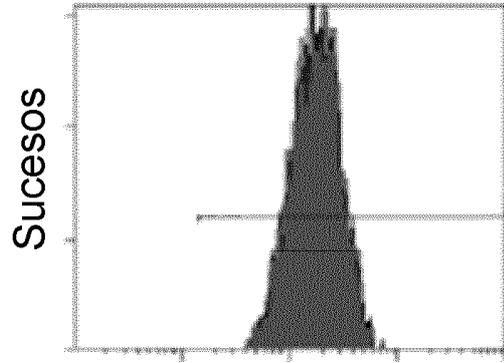


Figura 6

Clon 3C8

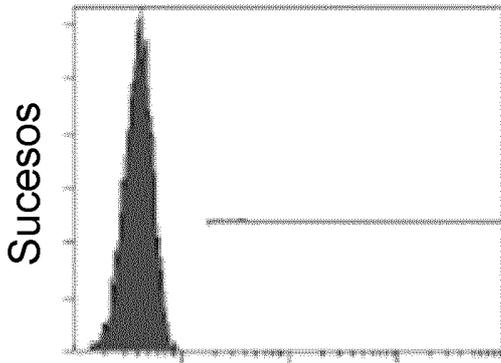


Isotipo PE

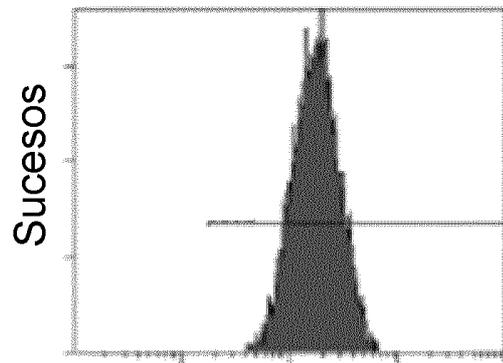


anti-CD303 PE

Clon 5G9



Isotipo PE



anti-CD303 PE

Figura 7

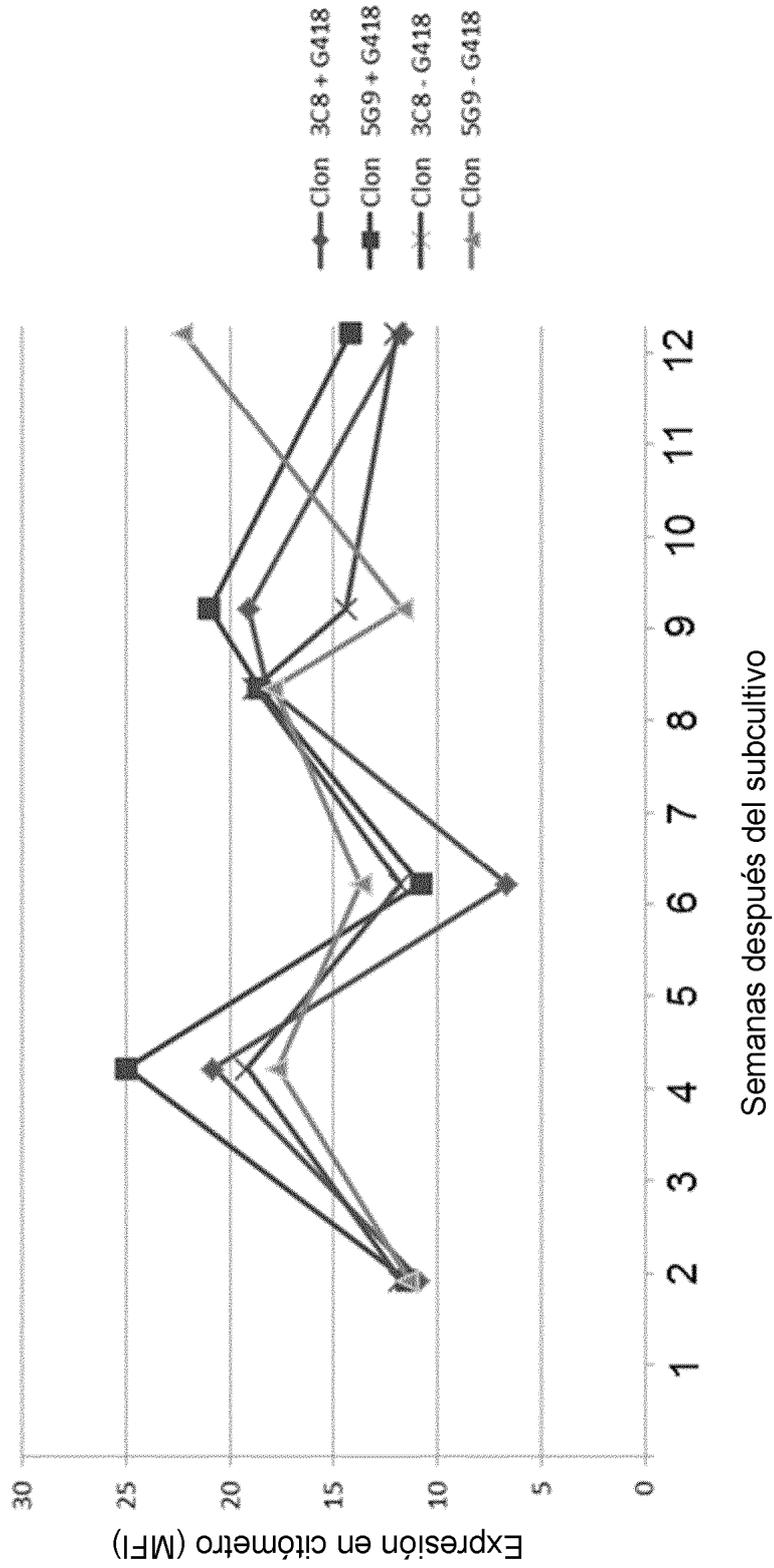
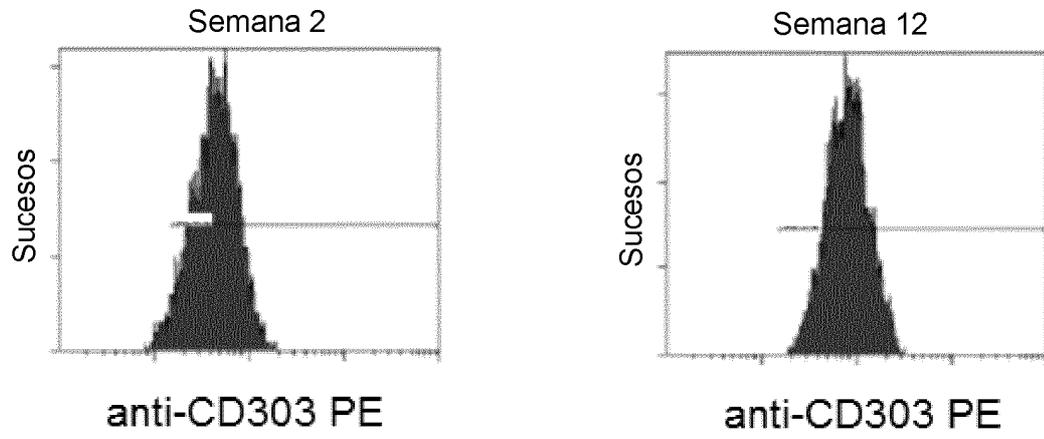


Figura 8

A

Clon 3C8 + G148



Clon 3C8 - G418

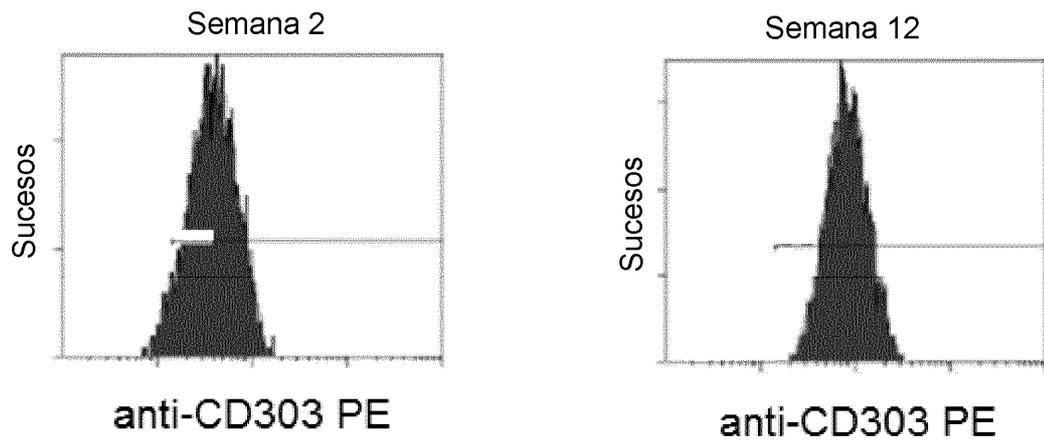
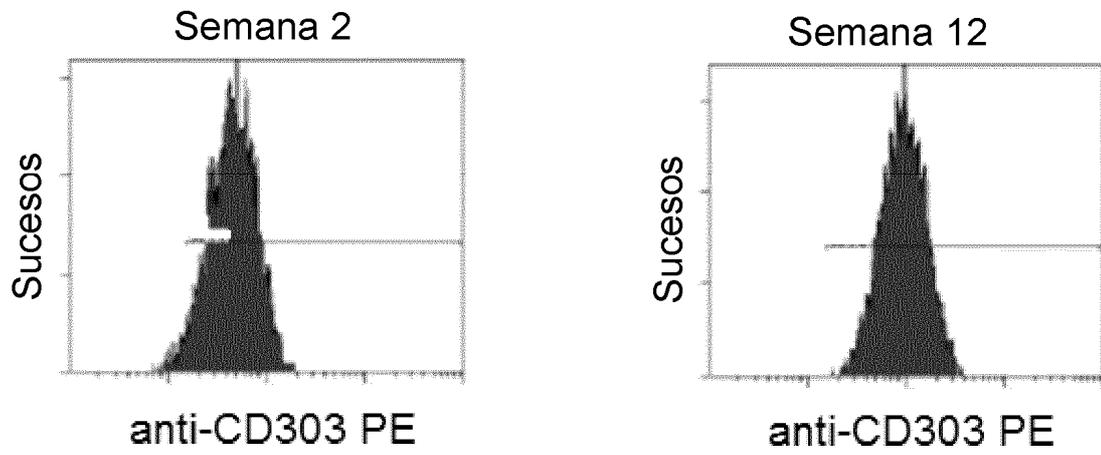


Figura 9A

B

Clon 5G9 + G148



Clon 5G9 - G418

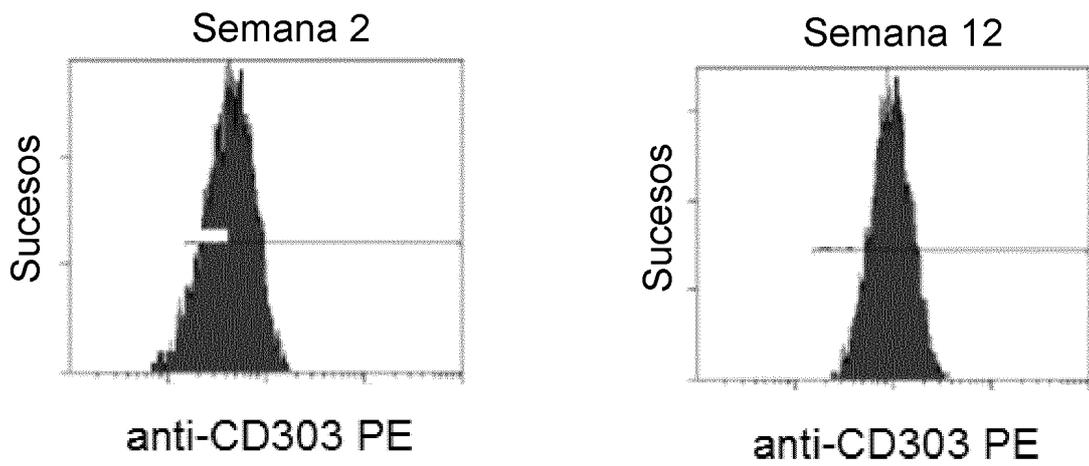


Figura 9B

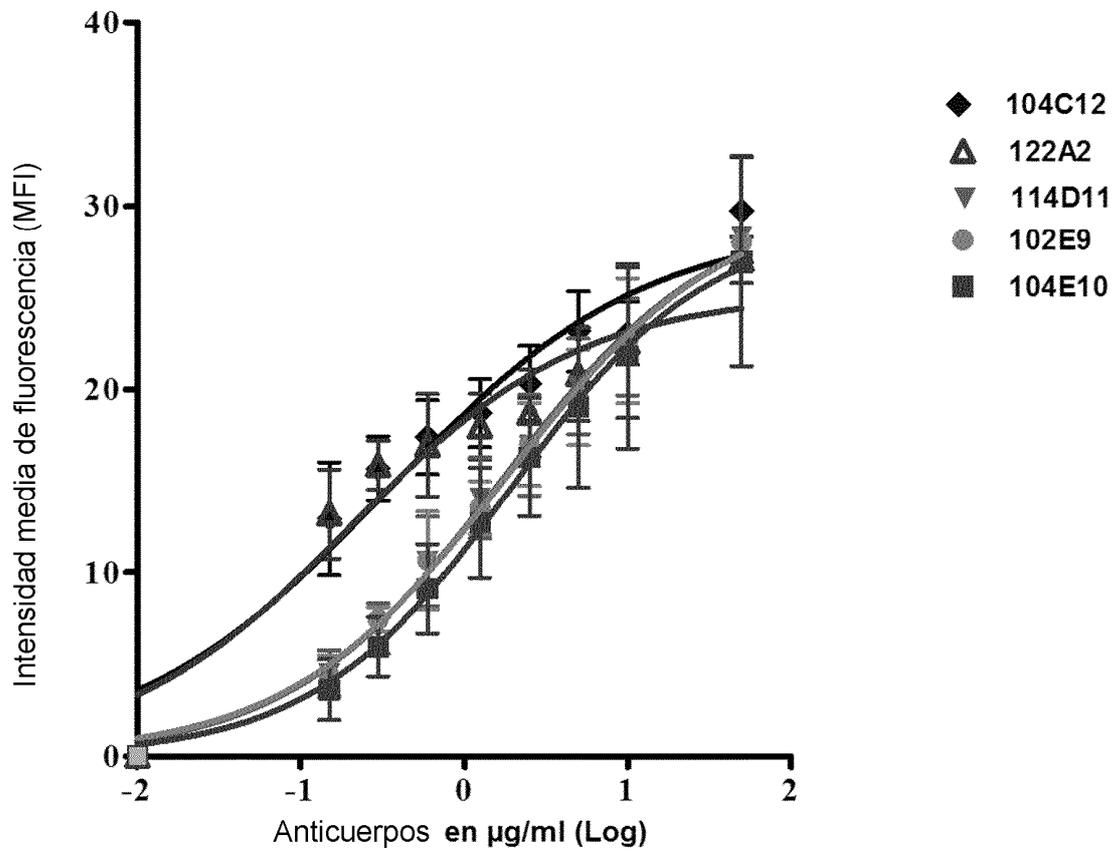


Figura 10

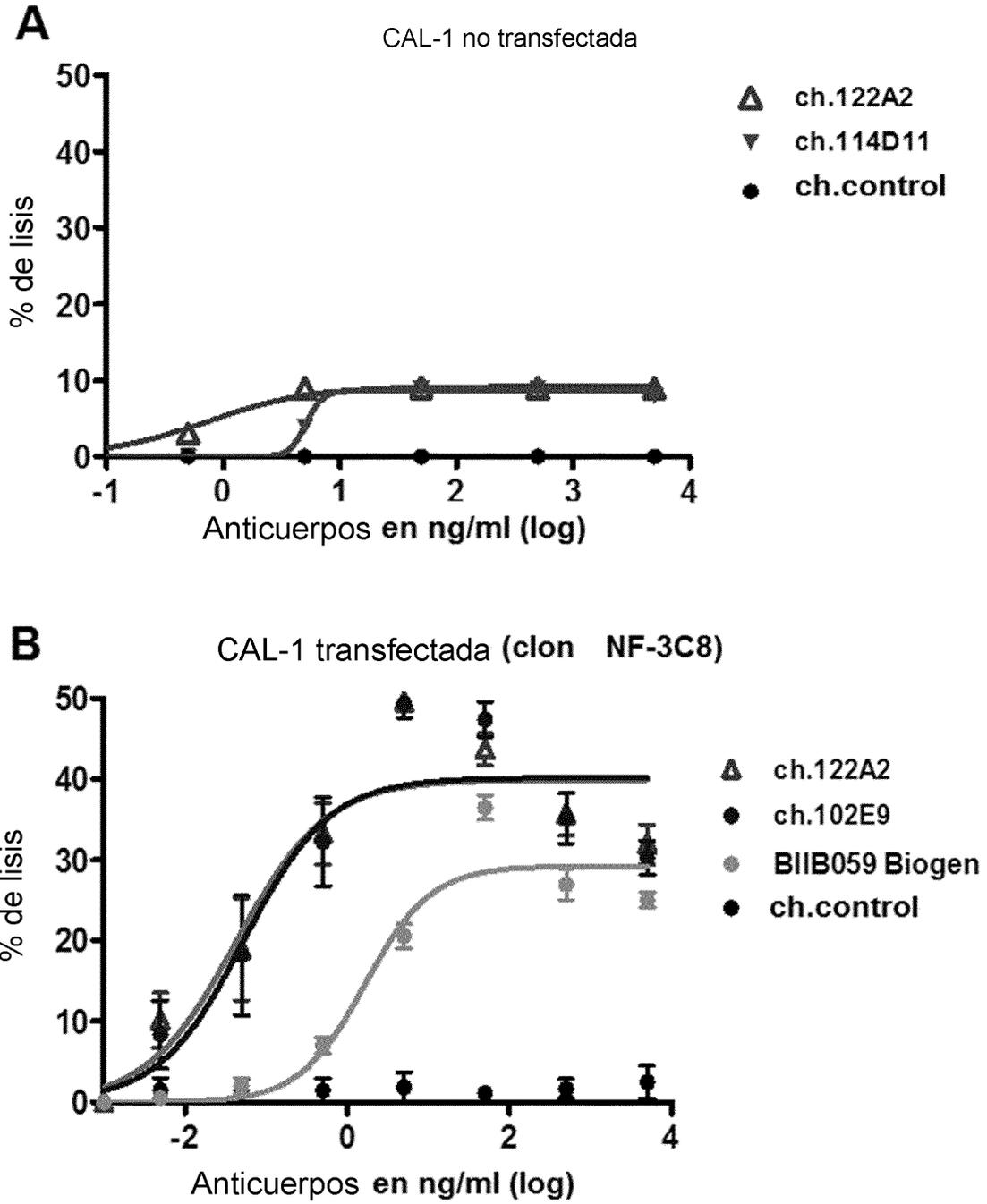


Figura 11A y 11B