



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 330 190**

(51) Int. Cl.:

C12M 3/02 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01929796 .9**

(96) Fecha de presentación : **10.05.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1366144**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

(54) Título: **Dispositivo para la preparación de células.**

(30) Prioridad: **10.05.2000 US 568254**
18.01.2001 GB 0101315
26.02.2001 US 271497 P
21.03.2001 GB 0107093

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2009

(73) Titular/es: **TriStem Trading (Cyprus) Limited**
Arch. Makariou III
2-4 Capital Center, 9th Floor, P.C. 1505
Nicosia, CY

(72) Inventor/es:
Abuljadayel, Ilham Mohamed Saleh Saeed

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Dispositivo para la preparación de células.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo. Concretando más, la presente invención se refiere a un dispositivo de preparación de una célula indiferenciada. En particular, pero no de manera exclusiva, la presente invención se refiere a un dispositivo de preparación de una célula indiferenciada a partir de una célula más “comprometida”.

10 **Antecedentes de la invención**

La diferenciación celular es un proceso en el que las estructuras y funciones resultan progresivamente comprometidas para originar células más especializadas, como por ejemplo la formación de células T o de células B a partir de precursores hematopoyéticos inmaduros. Por consiguiente, cuando las células resultan más comprometidas, resultan más especializadas. En la mayoría de los tipos de células de los mamíferos, la diferenciación de las células es un proceso unidireccional que conduce en último término a las células finalmente diferenciadas.

Sin embargo, aunque algunos tipos de células continúan a lo largo de su vida sin dividirse y sin ser sustituidas, muchos tipos de células sí continúan dividiéndose durante el tiempo de vida del organismo y experimentan una renovación. Ello puede efectuarse mediante división simple (por ejemplo las células del hígado), o como en el caso de determinadas células, como por ejemplo las células hematopoyéticas y las células epidérmicas, mediante la división de células madre relativamente indiferenciadas seguido por el compromiso de una o más células hijas con un programa de diferenciación irreversible subsecuente. Todos estos procesos, sin embargo, tienen una característica en común: las células, o bien mantienen su estado de diferenciación o resultan más diferenciadas. No resultan más indiferenciadas o incluso menos diferenciadas.

La retrodiferenciación es un proceso mediante el cual las estructuras y funciones de las células se modifican de manera progresiva para originar células menos especializadas. Algunas células experimentan de forma natural una diferenciación inversa limitada (retrodiferenciación) *in vivo* en respuesta a la lesión del tejido. Por ejemplo, se ha observado que las células del hígado revierten hasta una pauta de expresión enzimática similar a la pauta enzimática fetal durante la regeneración del hígado (Curtin y Snell, 1983, Br. J. Cancer, Vol. 48; 495-505).

En los documentos WO 96/23870 y GB 2297558 se puso de manifiesto que era posible tratar células diferenciadas de manera que se convirtieran en células indiferenciadas, incluyendo células madre. Estas células indiferenciadas fueron capaces de proliferar y de originar una prole rediferenciada del mismo linaje o de cualquier otro linaje. En el caso de células hematopoyéticas retrodiferenciadas, estas células madre son pluripotentes y pueden originar más de un linaje de células. Las conclusiones fundamentales del documento WO 96/23870 fueron completamente inesperadas.

Las implicaciones clínicas de este hallazgo son enormes. Las células madre son extremadamente difíciles de obtener de pacientes humanos. Típicamente se obtienen del tejido umbilical, de la médula ósea o de la sangre en los que están presentes solo en muy pequeñas cantidades. Sin embargo, la presente invención proporciona un dispositivo para producir células madre a partir de células más comprometidas, en particular mediante el proceso de retrodiferenciación.

El documento US 6,087,168 divulga un procedimiento de transdiferenciación de células epidérmicas en células neuronales, procedimiento en el cual las células epidérmicas son diferenciadas o retrodiferenciadas con un medio apropiado. Así mismo, Lake JA *et al.*, Journal of Cell Science 113, 556-566 (2000) y Rathjen J *et al.*, Journal of Cell Science 112, 601-612 (1999) divulgan la retrodiferenciación de células madre embrionarias (ES) en células tempranas primitivas de tipo ectodérmico (EPL), en respuesta a dos factores separables.

Así mismo, el documento US 5,635,387 describe un procedimiento y un dispositivo para incrementar el número de células precursoras hematopoyéticas humanas *in vitro*. En particular, el dispositivo comprende un medio de separación de células escogidas como diana de células no constitutivas de la diana en una muestra mezclada y un medio para cultivar las células escogidas como diana para incrementar el número de células escogidas como diana respecto de la muestra inicial. Así mismo, el dispositivo comprende también unos sensores y una válvula que detectan y controlan el flujo de fluido dentro del vaso del cultivo.

60 **Sumario de la invención**

En términos generales, se proporciona un dispositivo de preparación de una célula indiferenciada, en el que el dispositivo comprende un medio para posibilitar que una célula más comprometida se retrodiferencia en una célula indiferenciada. Ninguno de los documentos de la técnica anterior (como por ejemplo los documentos US 6,087,168, No. 96/23870, US 5,635,387, de Lake *et al.*, o de Rathjen *et al.*) divulgan un dispositivo apropiado para su uso en la preparación de células indiferenciadas.

Aunque la preparación de células indiferenciadas puede llevarse a cabo por una persona experta en la materia sin el uso de un dispositivo de acuerdo con la presente invención, el producto final tiende a ser inconsecuente en cuanto

que, cada vez que el procedimiento se lleva a cabo, los resultados dependen de la cualificación y de la experiencia de la persona que lleva a cabo el procedimiento. Así mismo, el tiempo de "contacto manual" requerido para preparar manualmente las células indiferenciadas es prolongado y, por tanto, no es rentable para un laboratorio.

- 5 En una forma de realización específica, se proporciona un dispositivo para constituir y/o incrementar el número relativo de células indiferenciadas de una población de células que incluye células comprometidas, dispositivo que incluye una cámara, un medio de introducción dentro de dicha cámara de una población de células que incluye células comprometidas, un medio de introducción en dicha cámara de unos medios de retrodiferenciación que sean capaces de que una célula comprometida se retrodiferencie en una célula retrodiferenciada, y un medio de incubación para
10 incubar dichas células comprometidas en presencia de dichos medios de retrodiferenciación, de manera que una célula comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada.

En otra forma de realización específica, se proporciona un dispositivo para constituir y/o incrementar el número de células indiferenciadas de una población de células que incluye células comprometidas, dispositivo que comprende
15 una cámara, un medio de introducción dentro de dicha cámara de una población de células que incluye células comprometidas, un medio de introducción dentro de dicha cámara de un agente que provoca que una célula comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada, y un medio de incubación para incubar dicho agente y dichas células comprometidas, de tal manera que una célula comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada.

- 20 De forma preferente, el agente conecta con un receptor que media en la captura, el reconocimiento o la presentación de un antígeno existente en la superficie de las células comprometidas. De modo más preferente el receptor es un antígeno de clase I del MHC o un antígeno de clase II del MHC, como por ejemplo un antígeno de clase I seleccionado entre un receptor de Leucocito-Humano-Asociado (HLA) A, un receptor de HLA-B, un receptor de HLA-C, un receptor de HLA-E, un receptor de HLA-F o un receptor de HLA-G. o un antígeno de clase II seleccionado entre un
25 receptor de HLA-DM, un receptor de HLA-DP, un receptor de HLA-DQ o un receptor de HLA-DR.

Convenientemente, el receptor puede comprender una cadena β que presente regiones homólogas. De modo preferente, el receptor puede comprender al menos la región homóloga de la cadena β del HLA-DR.

- 30 Típicamente, las células comprometidas son células diferenciadas, de modo preferente, las células comprometidas son células hematopoyéticas comprometidas, de modo preferente células seleccionadas entre las células de formación de colonias de células T (células CFC-T), células de formación de colonias de células B (células CFC-B), células de formación de colonias eosinófilas (células CFC-Eosina), células de formación de colonias basófilas (células CFC-Bas), células de formación de colonias de granulocitos/monocitos (células CFC-GM), células de formación de colonias
35 de megacariocitos (células CFC-MEG), células de formación de descarga de eritrocitos (células BFC-E), células de formación de colonias de eritrocitos (células CFC-E), células T y células B.

En un ejemplo, la célula más comprometida no es una célula cancerosa. En otro ejemplo, el agente no es ni cancerígeno ni capaz de promover el crecimiento de un cáncer.

- 40 De modo más preferente el agente es un anticuerpo frente al receptor, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal frente al receptor. Ejemplos específicos incluyen el CR3/43 y el anticuerpo monoclonal TAL.1B5.

En un ejemplo adicional, el agente modula la expresión génica del MHC. Convenientemente, el agente puede
45 modular la expresión de la clase I del MHC y/o de la clase II del MHC.

De modo preferente, el agente es utilizado en combinación con un modificador biológico de la respuesta, como por ejemplo un agente alquilizante, por ejemplo un agente alquilizante que sea o conste de ciclofosfoamida.

- 50 Células indiferenciadas preferentes comprenden un antígeno de células madre. De modo más preferente las células indiferenciadas son seleccionadas entre una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente, una célula madre linfocítica, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal, una célula madre epitelial, una célula madre mesenquimatosas, una célula madre endotérmica, y una célula madre mielocítica. De modo preferente, las células indiferenciadas se caracterizan por una o más de las siguientes designaciones de marcador de superficie celular: CD34⁺,
55 HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 y/o CD45bajo. De modo más preferente, la célula indiferenciada es CD34⁺ y CD 38⁻, de modo más preferente aún, CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ y CD45bajo.

Así mismo, en la presente memoria se describe un dispositivo para incrementar el número relativo de células que presentan una designación de marcador de superficie celular CD34⁺, y/o CD38⁻ y/o HLA-DR⁻ y/o CD45 bajo
60 y/o CD90 y/o CD 117 y/o AC133 en una población de células que incluye células comprometidas, dispositivo que incluye:

- (i) una cámara,
- 65 (ii) un medio para introducir dentro de dicha cámara una población de células que incluyen células comprometidas,

(iii) un medio para introducir dentro de dicha cámara un agente que conecte operativamente con dichas células comprometidas; y

(iv) un medio de incubación operable para incubar dichas células comprometidas que están conectadas con dicho agente dentro de dicha cámara, de tal manera que el número relativo de las células de CD34⁺ y/o CD38⁻ y/o HLA-DR⁻ y/o CD45bajo y/o CD90 y/o CD117 y/o AC133 incrementa como resultado de dicha conexión.

Un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede, de modo opcional, comprender también un medio de purificación o aislamiento para enriquecer dichas células indiferenciadas, eliminar el agente, y/o recuperar dichas células indiferenciadas de la población de células alteradas. De modo preferente, el medio de purificación comprende un medio de identificación de un marcador de superficie celular presente sobre la superficie de la célula indiferenciada o de un marcador de superficie celular presente sobre la superficie de las células comprometidas pero sustancialmente ausente de superficie celular de las células indiferenciadas. Convenientemente, el medio de purificación puede utilizar anticuerpos levantados contra el marcador de superficie celular, por ejemplo. Ejemplos de marcadores adecuados incluyen el CD34, el CD45 y el HLA-DR. Solo a modo de ejemplo, un medio de purificación apropiado es el sistema de purificación CliniMACs/Isolex CD34+. En un ejemplo adicional dicho medio de purificación o aislamiento puede estar, de modo opcional, dispuesto como medio separado.

Un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede, de modo opcional, comprender así mismo un medio de enriquecimiento de células y/o de selección negativa corriente arriba. Como alternativa, la población de células puede ser, de modo opcional, seleccionada negativamente y/o enriquecida con células antes de la inserción dentro de dicho dispositivo.

En otro ejemplo, la célula indiferenciada de la invención es CD34⁻, CD45⁻ y negativa para marcadores de linajes hematopoyéticos.

Las células más diferenciadas pueden ser del mismo linaje que las células comprometidas originales o de un linaje diferente.

Así, además de producir células indiferenciadas, un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado para convertir las células de un linaje en las de otro linaje.

De acuerdo con ello, también se describe en la presente memoria un dispositivo de inducción en una población de células que comprende células hematopoyéticas comprometidas de un linaje hematopoyético para convertirlas en células de otro linaje hematopoyético, dispositivo que incluye:

(i) una cámara,

(ii) un medio de introducción dentro de dicha cámara de una población de células que incluye células comprometidas,

(iii) un medio de introducción dentro de dicha cámara de un agente que conecta activamente con un receptor que media en la captura, reconocimiento o presentación de un antígeno existente en la superficie de dichas células hematopoyéticas comprometidas; y

(iv) un medio de incubación que puede ser activado para incubar dichas células hematopoyéticas comprometidas que se conectan con dicho agente dentro de dicha cámara de forma que se convierten en células de otro linaje hematopoyético como resultado de dicha conexión.

De modo preferente, dichas células hematopoyéticas comprometidas son de un linaje de células B y se convierten en células de otro linaje hematopoyético seleccionado entre el linaje de células T y un linaje mieloide.

Las células indiferenciadas producidas por el dispositivo de la presente invención pueden ser utilizadas para fabricar un medicamento para el tratamiento de un desorden o enfermedad inmunológica. De modo similar, las células recomprometidas producidas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención pueden ser utilizadas para fabricar un medicamento para el tratamiento de un desorden o enfermedad inmunológica.

La presente invención resulta ventajosa en grado sumo, en cuanto ahora es posible preparar fácilmente células indiferenciadas a partir de células más comprometidas y a continuación utilizar esas células indiferenciadas como, o para preparar, medicamentos, ya sea *in vitro* o *in vivo* o combinaciones de éstos para el tratamiento de los desórdenes.

La presente invención es así mismo ventajosa en cuanto es posible utilizar el dispositivo para comprometer la célula indiferenciada preparada mediante retrodiferenciación a una célula recomprometida, como por ejemplo una nueva célula diferenciada, con la finalidad de corregir o suprimir la célula original más comprometida o de corregir o eliminar un producto de ésta. Por ejemplo, células indiferenciadas podrían ser utilizadas para producir células recomprometidas,

como por ejemplo las células que revisten los alvéolos de los pulmones, creando así un mecanismo mediante el cual el tejido pulmonar dañado o enfermo puede ser sustituido o reparado (véase Le Page, New Scientist 19 Diciembre 2000, p. 20).

- 5 El término “célula recomprometida” significa una célula derivada de una célula indiferenciada-esto es, una nueva célula más comprometida. “Más comprometida” significa más diferenciada y que puede fácilmente ser diferenciada con referencia a vías y etapas de diferenciación de las células.

10 Las células más indiferenciadas y las células diferenciadas comprenden los antígenos de Clase I y/o los antígenos de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Si estos antígenos están asociados con aquellas células entonces son llamados células de Clase I⁺ y/o Clase II⁺. De modo preferente la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula indiferenciada de Clase I⁺ del MHC y/o de Clase II⁺ del MHC.

15 De modo preferente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula indiferenciada que comprenda un antígeno de células madre.

De modo preferente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula indiferenciada CD34⁺.

20 De modo preferente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula progenitora linfematopoyética.

De modo preferente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula madre pluripotente.

25 De modo preferente, dicho incremento se produce dentro de las 24 horas, de modo preferente, de 4 a 8 horas (de manera que cualquier cambio no puede únicamente atribuirse a la proliferación de las células).

30 Típicamente, la determinación de los cambios en los números de las células diferenciadas se lleva a cabo controlando los cambios de los números de las células que incorporan marcadores de superficie celular característicos de las células indiferenciadas. Ejemplos de marcadores de superficie celular apropiados incluyen el CD34⁺, el HLA-DR⁻, el CD38⁻, el AC133, el CD90 y/o el CD45bajo. Como alternativa, o además de ello, pueden ser controladas las reducciones de los números de las células que incorporan marcadores de superficie celular típicos de células diferenciadas y no de células indiferenciadas.

35 Convenientemente, un dispositivo de acuerdo con la presente invención, puede, de modo opcional, comprender así mismo un medio de rastreo para controlar los cambios del número de las células que incorporan marcadores de superficie celular característicos de células indiferenciadas.

40 De modo preferente, las células comprometidas utilizadas en el ensayo son células hematopoyéticas comprometidas, como por ejemplo células seleccionadas entre las células CFC-T, células CFC-B, células CFC-Eosinas, células CFC-Bas, células CFC-GM, células CFC-MEG, células BFC-E, células CFC-E, células T y células B, de modo más preferente células B.

45 De modo preferente, un dispositivo de acuerdo con la presente invención comprende así mismo uno o más, de modo preferente dos o más, de modo más preferente tres o más, y todavía de modo más preferente cuatro o más, de los siguientes rasgos distintivos:

- (i) la medición de un medio para medir el volumen de una población de células,
- 50 (ii) un medio de recuento (como por ejemplo un contador Coulter, miniaturizado si es necesario, u otro citómetro apropiado) para efectuar los recuentos de las células y, de esta forma, medir la concentración del as células de una población de células,
- 55 (iii) un medio de transferencia para transferir una cantidad (como por ejemplo una cantidad predeterminada) de una población de células desde un recipiente de almacenaje hasta la cámara, un medio de transferencia que puede, de modo opcional, comprender una bomba, por ejemplo,
- (iv) un medio de cálculo para calcular el volumen del agente que va a ser añadido a la cámara, dependiendo el volumen del agente tanto del volumen como de la concentración de células de la población de células,
- 60 (v) un medio de transferencia adicional para transferir un volumen (como por ejemplo un volumen calculado) del agente hasta la cámara, medio adicional de transferencia que puede, de modo opcional, comprender por ejemplo, una jeringa accionada por un motor, por ejemplo un motor paso a paso,
- 65 (vi) un medio de control del dióxido de carbono (como parte del medio de incubación, por ejemplo) para controlar la concentración de dióxido de carbono existente en la cámara,

(vii) un medio de control de la temperatura (como parte, por ejemplo, del medio de incubación) para controlar la temperatura existente en la cámara,

(viii) un medio de mezcla (como parte, por ejemplo, del medio de incubación) para mezclar la población de células y el agente dentro de la cámara,

(ix) un medio de sincronización (como parte, por ejemplo, del medio de incubación) para sincronizar el periodo de incubación y, de modo opcional, un medio de representación para representar al usuario el periodo de tiempo restante y/o un medio de alarma para alertar al usuario sobre la culminación del periodo de incubación,

(x) un medio de recolección para recoger las células procedentes de la cámara, en particular para recoger las células indiferenciadas de la cámara,

(xi) un medio de retirada para retirar una población de células, que comprende células indiferenciadas, desde la cámara introduciéndolas en un recipiente de almacenaje; el medio de retirada puede, por ejemplo, comprender una bomba, y

(xii) un medio de sellado para sellar un recipiente de almacenaje que comprende una población de células que comprende células indiferenciadas.

Convenientemente, en un dispositivo de la presente invención, el medio de transferencia (iii) puede transferir una cantidad (como por ejemplo una cantidad predeterminada) de una población de células directamente de un paciente a dicha cámara (esto es, sin necesidad del recipiente de almacenaje) y/o el medio de retirada (xi) puede retirar una población de células comprendiendo células indiferenciadas, de la cámara directamente introduciéndolas en un paciente (esto es, sin necesidad del recipiente de almacenaje).

Convenientemente, el medio de transferencia (iii) puede comprender una bomba peristáltica, bomba que transfiera una población de células desde un recipiente de almacenaje a través de un medio de interconexión (por ejemplo un tubo), hasta la cámara. De modo preferente, el medio de interconexión pasa a través de un contador Coulter u otro citómetro apropiado (de acuerdo con lo expuesto en (ii)). De esta manera, la concentración de células de la población de células puede ser calculada durante la transferencia de la población de células desde el recipiente de almacenaje hasta la cámara.

De modo preferente, el (los) recipiente(s) de almacenaje mencionado (s) en (iii) y (xi) con anterioridad, son bolsas de almacenaje, las cuales son ventajosamente desechables. Resulta muy preferente que el recipiente de almacenaje de (iii) sea diferente del recipiente de almacenaje de (xi), siendo el primero un recipiente de almacenaje de entrada y siendo el segundo un recipiente de almacenaje de salida.

De modo preferente, el medio de transferencia adicional (v) comprende un depósito de agente con el fin de asegurar que exista suficiente cantidad de agente disponible en cualquier momento. Cuando el medio de transferencia es una jeringa, el depósito puede ser abastecido mediante una jeringa adicional, de tal manera que cuando una jeringa resulta agotada la otra jeringa comienza a suministrar el agente.

De modo preferente, el medio de control de dióxido de carbono para controlar la concentración de dióxido de carbono existente en la cámara comprende una válvula, la cual permite la introducción de una cantidad determinada de dióxido de carbono desde un cilindro de gas. La cantidad predeterminada de dióxido de carbono circula utilizando el volumen conocido de aire existente en la cámara, un tubo y un recipiente de almacenaje de salida y el volumen medido de la población de células a partir del recipiente de almacenaje de entrada. Convenientemente, el dióxido de carbono es introducido en la cámara a través de un orificio que es el mismo que aquel a través del cual el agente es añadido, de esta manera, el dióxido de carbono puede ser utilizado para purgar todo el agente que permanece en el orificio y en el equipamiento circundante. Además de lo expuesto el medio de control de dióxido de carbono puede así mismo comprender una vejiga inflable de aire para alojar el volumen suplementario de aire que resulta de la introducción de dióxido de carbono adicional dentro del sistema. Como alternativa, el recipiente de almacenaje de entrada, una vez vacío, puede actuar como vejiga de aire. De modo preferente, el dióxido de carbono es introducido para producir una concentración final de un 5% dentro de la cámara.

El medio de control de la temperatura (vii) puede convenientemente comprender un medio de calentamiento, medio que puede obtenerse, por ejemplo, mediante una placa calorífica situada por debajo de la cámara. Como alternativa, el medio de calentamiento puede obtenerse mediante una camisa exterior de agua calentada situada en posición adyacente a la cámara o a una porción de ésta. Resulta muy preferente que la temperatura existente en la cámara sea controlada entre, de modo aproximado 25°C y, de modo aproximado, 37°C.

El medio de mezcla (viii) comprende, de modo preferente, al menos un brazo de paleta, el cual rota lentamente con el fin de mezclar la población de células y del agente dentro de la cámara. Un agitador magnético podría, como alternativa, ser utilizado. Como otra alternativa adicional, la cámara podría ser agitada de forma mecánica, por ejemplo, mediante sacudidas suaves. Una ventaja de la utilización de un medio de mezcla que comprende al menos un brazo

ES 2 330 190 T3

de paleta es que el brazo puede también estar diseñado para actuar como raspador durante la recogida de las células, esto es, de tal manera que el brazo lentamente haga rotar las células fijadas a la superficie de la cámara y las desaloje suavemente. De modo ventajoso, el medio de mezcla puede ser accionado para efectuar un movimiento giratorio.

5 De modo preferente, el medio de retirada (xi) comprende una bomba peristáltica. Ventajosamente, el medio de retirada aspira la población de células, incluyendo las células indiferenciadas, a través de un orificio de salida situado en el fondo de la cámara e introduciéndolas en el recipiente de almacenaje de salida a través del medio de interconexión, como por ejemplo un tubo.

10 Como alternativa o además del medio de retirada, un agente secuestrante de iones libres y/o agente quelante, por ejemplo un anticoagulante como el EDTA, puede ser añadido a la cámara antes de la retirada de ésta de una población de células. La adición de dicho agente secuestrante de iones y/o quelante a la cámara provoca que las colonias de células madre se desagreguen en una suspensión de células individuales y, por consiguiente, facilita la retirada de células de la cámara mediante un medio de purga.

15 El medio de sellado (xii) comprende, de modo preferente, un sellador térmico, sellador térmico que cierra el recipiente de almacenaje de salida presionando entre sí dos porciones del recipiente o dos porciones del medio de intraconexión inmediatamente antes que el recipiente hasta que se produzca un completo cierre hermético. Por ejemplo, el sellador térmico puede traducirse en un sellado que tenga una anchura aproximada de 2 cm, a continuación el
20 sellador térmico corta el sello a lo largo de una porción central de éste.

De modo preferente, cada porción del dispositivo de acuerdo con la presente invención puede ser controlado de manera independiente por un sistema informático central. Ventajosamente, el sistema informático es capaz de recibir señales de entrada procedentes de una porción del dispositivo, efectuando los cálculos en base a esas señales de entrada
25 y enviando las señales de salida hasta una misma u otra porción adicional del dispositivo.

El dispositivo de la presente invención tiene varias ventajas, en particular el dispositivo asegura que se obtenga un resultado uniforme cada vez que el procedimiento se lleve a cabo y que no se produzca la pérdida de agentes valiosos. Así mismo, el dispositivo puede estar programado para alertar al usuario cuando la retrodiferenciación ha finalizado
30 y/o para representar el tiempo que resta antes de la conclusión. Si está programado para hacerlo, el dispositivo puede invitar al usuario a adquirir un nuevo agente. Es decir, el dispositivo puede controlar el uso del agente y la cantidad almacenada, y, de esta forma, puede invitar al usuario cuando la cantidad de agente almacenado cae por debajo de un nivel crítico.

35 El dispositivo de la presente invención puede así mismo comprender una pluralidad de cámaras cada una para producir una célula indiferenciada comprometida con diferentes linajes de células, por ejemplo de los músculos, del pelo, neuronas, etc. De esta forma, puede producirse una obtención simultánea de células indiferenciadas comprometidas con diferentes linajes de células. De modo preferente, cuando se utiliza una pluralidad de cámaras, cada cámara tiene un orificio de salida separado y un recipiente de almacenaje de salida separado.

40 Los linajes de células pueden ser controlados en el dispositivo de la presente invención utilizando plástico para la (s) cámara (s) tratados de manera diferente o mediante la adición de sustancias químicas diferentes dentro de cada cámara.

45 De modo preferente, uno o más de los componentes del dispositivo son desechables. Por ejemplo, uno o más de los siguientes componentes pueden ser desechables: la cámara, el recipiente de almacenaje de entrada, el recipiente de almacenaje de salida, el medio de interconexión que conecta los recipientes de almacenaje con la cámara, y el medio de transferencia adicional (v). Convenientemente, los componentes desechables pueden ser utilizados en forma de cartucho para su inserción dentro del dispositivo. A modo solo de ejemplo, un cartucho puede comprender una
50 primera bolsa de sangre (recipiente de almacenaje de entrada), una cámara y una segunda (de salida) bolsa de sangre estando la cámara conectada a cada una de las primera y segunda bolsas de sangre mediante un tubo (medio de interconexión). Convenientemente, el dispositivo puede ser considerado en parte como instrumento y en parte como desechable.

55 De modo preferente, la cámara y/u otros componentes del dispositivo en contacto con la población de células están formulados entre el material USP de clase VI, placas de policarbonato, u otros materiales plásticos no capaces de ocasionar otras formas de transformantes de células.

60 De modo preferente, la población de células que comprende células comprometidas es sangre. De modo preferente, el agente es un anticuerpo.

En la presente memoria se describe así mismo un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento la retrodiferenciación de una célula más comprometida en una célula indiferenciada, en el que la retrodiferenciación de la célula más comprometida se produce a una célula más comprometida en o a partir
65 de una muestra de sangre o capa leucocítica.

Así mismo, en la presente memoria se describe también un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento el contacto con una célula más comprometida en o a partir de una muestra

de sangre de capa leucocítica con un agente que provoque que la célula más comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada.

Como máxima preferencia, la célula más comprometida no es una célula cancerosa. En otro ejemplo preferente, el agente no es carcinogénico ni capaz de promover el crecimiento de un cáncer.

De modo preferente, las células comprometidas son diferenciadas. De modo preferente, las células comprometidas son células comprometidas hematopoyéticas, como por ejemplo la célula seleccionada entre las células CFC- T, las células CFC-B, las células CFC-Eosin, a células CFC-Bas, células CFC-GM, células CFC-MEG, células BFC-E, células CFC-E, células T y células B, de modo más preferente células B.

De modo más preferente, las células indiferenciadas son células indiferenciadas seleccionadas entre una célula madre pluripotente, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal, una célula madre epitelial, una célula madre mesenquimatosa y una célula madre embrionaria. De modo preferente, las células indiferenciadas están caracterizadas por una o más de las siguientes designaciones de marcadores de superficie celular: CD34⁺, HLA-DR, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 y/o CD45bajo. De modo más preferente, la célula indiferenciada es CD34⁺ y CD38⁻, incluso de modo más preferente, CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ y CD45bajo.

Convenientemente, las células indiferenciadas son células de clase I⁺ del MHC y/o de clase II⁺ del MHC.

De modo preferente, el agente conecta con un receptor que media en la captura, reconocimiento o presentación de un antígeno en la superficie de las células comprometidas. De modo más preferente, el receptor es un antígeno de clase I del MHC o un antígeno de clase II del MHC, como por ejemplo un antígeno de clase I seleccionado entre el receptor de Leucocito-Humano-Asociado (HLA)-A, un receptor de HLA-B, un receptor de HLA-C, un receptor de HLA-E, un receptor de HLA-F o un receptor de HLA-G o un antígeno de clase II seleccionado entre un receptor de HLA-DM, un receptor de HLA-DP, un receptor de HLA-Q, o un receptor de HLA-DR.

Convenientemente, el receptor puede comprender una cadena β que tenga regiones homólogas. En una forma de realización, el receptor puede comprender al menos las regiones homólogas de la cadena β de HLA-DR.

Como máxima preferencia, el agente es un anticuerpo frente al receptor, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal frente al receptor. Ejemplos específicos incluyen el CR3/43 y el anticuerpo monoclonal TAL.1B5.

Convenientemente, el agente puede modular la expresión génica del MHC, por ejemplo la expresión de clase I⁺ del MHC y/o de clase II⁺ del MHC.

En la presente memoria se describe también un procedimiento para incrementar el número relativo de células que tengan una designación de marcador de superficie celular CD34⁺ y/o HLA-DR⁻ y/o CD38⁻ y/o CD117 y/o AC133 y/o CD90, y/o CD45bajo en una muestra de sangre de capa leucocítica, comprendiendo el procedimiento el contacto de una célula más comprometida dentro de una muestra de sangre de capa leucocítica con un agente que conecte operativamente con dichas células comprometidas, de manera que el número relativo de las células CD34⁺ y/o HLA-DR⁻ y/o CD38⁻ y/o CD117 y/o AC133 y/o CD90, y/o CD45bajo se incrementa como resultado de dicha conexión.

En un aspecto adicional más, en la presente memoria se describe también un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento el contacto de una o más células diferenciadas de una población de células con un medio de retrodiferenciación eficaz para desplazar la relación de las células diferenciadas normales existentes en dicha población, por medio de lo cual se provoca que una o más de dichas células diferenciadas se rediferencie en una (s) célula (s) indiferenciada (s).

En un aspecto adicional, se describe también, el uso de un medio de retrodiferenciación para desplazar la relación de las células diferenciadas normales de una población de células para efectuar la retrodiferenciación de una o más de dichas células diferenciadas en una (s) célula (s) indiferenciada (s).

En un aspecto adicional más, en la presente memoria se describe un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento la retrodiferenciación de una célula diferenciada de una población de células en una célula indiferenciada, en el que el entorno que comprende dicha población de células que comprende una o más células diferenciadas se modifica de un primer entorno a un segundo entorno en el que la concentración de iones libres de dicho segundo entorno se modifica de modo eficaz en comparación con el primer entorno para provocar que una o más de dichas células diferenciadas se retrodiferencie en una (s) célula (s) indiferenciada (s).

En un aspecto adicional más, en la presente memoria se describe un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento el contacto de una o más células diferenciadas de una población de células con un medio de retrodiferenciación efectivo para desplazar la relación de las células diferenciadas normales, el cultivo de la población de células en un primer entorno de iones secuestrados o de iones libres, y la modificación de dicho primer entorno en un segundo entorno en el que la concentración de iones presente en el segundo entorno es modificado de modo eficaz en comparación con el primer entorno, para conseguir de esta forma que una o más de las células diferenciadas se retrodiferencie en una (s) célula (s) indiferenciada (s).

De modo preferente, el medio de retrodiferenciación es cualquier medio que provoque la disrupción de la relación de células diferenciadas normales de una población de células, lo que en adelante se denomina en la presente memoria selección negativa, dentro de la población de células y provoque de esta forma una disrupción de la relación de las células diferenciadas normales de la población de células.

El medio de retrodiferenciación puede ser, por ejemplo, uno cualquiera o más de los siguientes medios: Un anti-cuerpo (puro y conjugado esto es, unido a unos ligandos fijos y libres, como por ejemplo microesferas magnéticas o de vidrio o de polistireno); Histopaque, LymphoPrep (Sigma) o cualquier otro medio gradiente de densidades utilizado para separar células de acuerdo con la densidad de las células; o Dextran (el cual provoca la sedimentación de los glóbulos rojos). Otros medios apropiados que provocan el desplazamiento de células se muestran en Vettese-Dadey (The Scientist, 13 Sep. 1999, 13 (18): 21).

De modo preferente, la concentración de iones libres del segundo entorno se incrementa en comparación con la del primer entorno.

De modo más preferente, la concentración relativa de iones libres de los primero y segundo entornos se incrementa, esto es, la concentración de iones libres del segundo entorno se incrementan. De modo preferente, la concentración relativa de iones se incrementa en la medida suficiente para provocar que una o más de las células diferenciadas se retrodiferencie en una (s) célula (s) indiferenciada (s). Solo a modo de ejemplo, la transferencia de células desde un medio que contenga EDTA de 5 mM (un agente secuestrante de iones libres y/o quelante) hasta un medio adicional que contenga menos EDTA o no contenga EDTA provoca un incremento de la concentración de iones libres (por ejemplo una concentración de iones de calcio) suficiente para provocar la retrodiferenciación.

De modo preferente, el ión libre es un anión.

De modo preferente, el ión libre es un metal del grupo I o del grupo II.

De modo preferente, el anión es un ión de calcio y/o un ión de magnesio.

Convenientemente, la concentración de iones libres de un entorno puede ser modificada mediante el tratamiento de un entorno con un agente capaz de modificar relativamente la concentración de iones libres del entorno.

De esta forma, en la presente memoria se describe como ejemplo preferente, un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento la retrodiferenciación de una célula diferenciada de una población de células en una célula indiferenciada, en el que el entorno que comprende dicha población de células es modificado mediante el tratamiento de un primer entorno con un agente capaz de modificar relativamente la concentración de iones libres del entorno para obtener un segundo entorno.

Por ejemplo, el primer entorno puede ser tratado con uno o más agentes de secuestro de iones libres cuya presencia a continuación es suprimida o reducida para obtener con ello un segundo entorno que tenga una concentración de iones libres relativamente incrementada, obteniendo con ello la retrodiferenciación de una o más células diferenciadas de la población de células. Es decir, el agente de secuestro puede ser suprimido o reducido, por ejemplo, mediante la supresión física/química del o de parte del agente de secuestro respecto del primer entorno o mediante transferencia de la población de células a un segundo entorno sin dicho agente de secuestro de iones libres o con un agente de secuestro de iones libres con una concentración más baja de la existente en el primer entorno.

En cualquier caso, el segundo entorno tiene una concentración de iones libres incrementada en comparación con el primer entorno, obteniendo de esta forma la retrodiferenciación de una o más células diferenciadas de la concentración de células.

Como alternativa, la concentración de células puede ser cultivada en un primer entorno que comprenda una concentración baja o cero de iones libres seguida por la transferencia de la población de células para, o ajustar el primer entorno de manera que se convierta en un segundo entorno que comprenda iones, o que comprenda iones con una concentración más alta que el primer entorno, obteniendo así la retrodiferenciación de una o más células diferenciadas de la población de células. El término "baja" utilizada en la presente memoria incluye un entorno con una concentración inicial de iones libres relativamente baja respecto de la concentración final del segundo entorno.

De esta forma, en la presente memoria se describe también un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento la retrodiferenciación de una célula diferenciada de una población de células en una célula indiferenciada, en el que el entorno que comprende dicha población de células que comprende una o más células diferenciadas se modifica de un primer entorno que tiene una concentración baja o cero de iones libres de calcio o magnesio en un segundo entorno que comprende iones de calcio o magnesio libres o que comprende iones de calcio o magnesio libres con una concentración más alta que la del primer entorno, efectuándose de esta manera la retrodiferenciación de una o más células diferenciadas de la población de células.

Sin pretender quedar constreñidos por teoría alguna, se cree que los cambios en la concentración de los iones, en particular los incrementos en la concentración de iones, provoca que las células de la población de células se agreguen

formando colonias (por ejemplo, experimentan la agregación homotípica), y que el contacto físico entre dichas células puede inducir las a que se retrodiferencien.

De modo preferente, el agente de secuestro es un agente quelante de iones.

De modo preferente, el agente de secuestro comprende tanto una amina como un grupo carboxílico.

De modo preferente, el agente de secuestro comprende una pluralidad de grupos- $N(CH_2CO_2H)_n$, en el que $n = 1$ o $n = 2$.

Convenientemente, el agente de secuestro puede ser seleccionado entre cualquiera o más de los siguientes: EDTA, heparina, EGTA, DTPA, citrato de trisodio y otros agentes quelantes similares y/o anticoagulantes.

Convenientemente, el agente de secuestro debe ser añadido en una concentración suficientemente alta para que la retirada de su presencia provoque la retrodiferenciación. Típicamente, la concentración suficiente del agente de secuestro para provocar la retrodiferenciación cuando se produce la retirada de éste es más de o igual a, de forma aproximada, 2 mM.

En un ejemplo preferente, la célula más comprometida no es una célula cancerosa. En otro ejemplo preferente el agente no es ni carcinogénico ni es capaz de promover el crecimiento de un cáncer.

De modo preferente, las células comprometidas son diferenciadas. De modo preferente, las células comprometidas son células hematopoyéticas comprometidas, como por ejemplo las células seleccionadas entre las células CFC -T, células CFC-B, células CFC-Esoina, células CFC-Bas, células CFC-GM, células CFC-MEG, células BFC-E, células CFC-E, células T y células B, de modo más preferente células B.

De modo preferente, las células indiferenciadas son células indiferenciadas seleccionadas entre una célula madre pluripotente, una célula madre hematopoyética, una célula madre neuronal, una célula madre mesenquimatosas, y una célula madre embrionaria. De modo preferente, las células indiferenciadas se caracterizan por una o más de las siguientes designaciones de los marcadores de superficie celular: $CDR34^+$, $HLA-DR^-$, $CD38^-$, $CD117$, $AC133$, $CD90$, y/o $CD45$ bajo. De modo más preferente, la célula indiferenciada es $CD34^+$ y $CD38^-$, incluso de modo más preferente $CD34^+$, $CD38^-$, $HLA-DR^-$ y $CD45$ bajo.

De esta forma, en la presente memoria se describe también un procedimiento de preparación de una célula indiferenciada, comprendiendo el procedimiento la retrodiferenciación de una célula hematopoyética diferenciada de una población de células en una célula indiferenciada, en el que el entorno que comprende dicha población de células que comprende una o más células hematopoyéticas diferenciadas se modifica de un primer entorno a un segundo entorno en el que la concentración de iones libres de dicho segundo entorno es modificado de modo efectivo en comparación con el primer entorno para provocar que una o más de dichas células hematopoyéticas diferenciadas se retrodiferencien en una (s) célula (s) indiferenciada (s).

Convenientemente, las células indiferenciadas son células de clase I^+ del MHC y/o de clase II^+ del MHC.

En un ejemplo, la población de células que incluye células comprometidas es una muestra de sangre de capa linfocítica, o procede de una muestra de sangre de capa leucocítica.

De modo ventajoso, un procedimiento descrito en la presente memoria puede ser utilizado para cultivar de modo efectivo progenitores eritroides para la producción de eritrocitos, eritrocitos que pueden ser utilizados para reponer carencias en los suministros de sangre, por ejemplo. Convenientemente, un procedimiento descrito en la presente memoria puede ser utilizado para producir megacariocitos para su uso en la producción de plaquetas.

Con el fin de que la presente invención pueda ser fácilmente comprendida y fácilmente puesta en práctica a continuación se hará referencia, a modo de ejemplo, a los dibujos que se acompañan.

La Figura 1 muestra una vista en perspectiva de un dispositivo de acuerdo con la presente invención con su panel frontal abierto, junto con un inserto que muestra una sección del dispositivo exenta de sus elementos circundantes;

la Figura 2 muestra una vista en perspectiva del dispositivo de la Figura 1 con su panel frontal cerrado;

la Figura 3 muestra una fotografía de células sanguíneas;

la Figura 4 muestra una gráfica de la diferenciación de las LSCs para formar las células T y las células B;

la Figura 5 muestra una gráfica de la diferenciación de las MSCs para formar eosinófilos, basófilos, neutrófilos, megacariocitos, monocitos, eritrocitos, granulocitos, mastocitos, NKs, y linfocitos;

la Figura 6 muestra unas células progenitoras linfohematopoyéticas;

la Figura 7 muestra la apariencia de las células CD45⁺ CD14⁺ después del tratamiento con anticuerpos CR3/43;

la Figura 8 muestra una imagen al microscopio de células diferenciadas B;

la Figura 9 muestra una imagen al microscopio de células indiferenciadas constituidas mediante la retrodiferenciación de células B;

la Figura 10 muestra una imagen al microscopio de las mismas células indiferenciadas de la Figura 9 pero con una magnificación reducida;

la Figura 11 muestra una imagen al microscopio de las células diferenciadas B;

la Figura 12 muestra una imagen al microscopio de células indiferenciadas constituidas mediante la retrodiferenciación de células B;

la Figura 13 muestra una imagen al microscopio de la formación de células granulocíticas diferenciadas a partir de las mismas células indiferenciadas de la Figura 12;

la Figura 14 muestra en dos ampliaciones diferentes, imágenes al microscopio de una muestra de sangre no tratada de un paciente con BCLL;

la Figura 15 muestra una imagen al microscopio de una muestra de sangre tratada;

las Figuras 16 y 17 muestran imágenes al microscopio de tiempo continuo durante el tratamiento de muestras de sangre;

la Figura 18 muestra una transferencia de Southern;

la Figura 19 muestra unas transferencias de Southern adicionales obtenidas utilizando células sanguíneas periféricas de pacientes con B-CLL;

la Figura 20 muestra el uso de tres agentes para incrementar el número relativo de células CD34⁺ de una población de células;

la Figura 21 muestra un ensayo de colonia de células madre utilizando un microscopio invertido de campo brillante;

la Figura 22 muestra una capa de células adherentes vistas con el microscopio invertido de campo brillante; y

la Figura 23 muestra dos imágenes fijas de un vídeo de tiempo continuo durante el tratamiento de células B con mab PCR3/43.

Descripción detallada de la invención

I. Dispositivo

El dispositivo se representa genéricamente mediante la referencia numeral 1 y comprende una carcasa 2 que presenta un panel frontal 3, panel 3 que está abierto para permitir el acceso al interior del dispositivo 1. Un recipiente de almacenaje de entrada, a saber una bolsa de sangre 4, cuelga de un gancho de soporte 5. El gancho de soporte 5 forma parte de una balanza electrónica (no mostrada) que puede ser accionada para pesar la bolsa de sangre de entrada 4.

El dispositivo comprende así mismo una cámara 6, cámara 6 que está conectada a la bolsa de sangre 4 por medio de un tubo 7. El tubo 7 comprende una ventana transparente 8, ventana que está dispuesta dentro de una cédula de flujo de contador Coulter 9. Una bomba peristáltica (no mostrada) puede ser accionada para aspirar la sangre procedente de la bolsa de sangre 4 a través de la cédula de flujo de contador Coulter 9 e introducirla en la cámara 6.

Unas jeringas 10 y 11 contienen antígeno y, cada una, es accionada por un motor paso a paso (no mostrado). Las jeringas 10, 11 se mantienen permanentemente a 4°C dentro de un "refrigerador" 12 Peltier aislado bloqueable. Dos jeringas 10, 11 están dispuestas con el fin de asegurar que el dispositivo tenga siempre el suficiente suministro de anticuerpos. La esterilidad de las jeringas 10, 11 se mantiene tanto mediante antibióticos como mediante filtros desechables de 0,2 µm (designados genéricamente con la referencia numeral 13).

El dispositivo comprende así mismo un dispositivo de entrada 14 de dióxido de carbono, el cual dirige el dióxido de carbono desde un cilindro de gas (no mostrado) hasta el interior de la cámara 6 a través del tubo 15. Las jeringas 10, 11 están así mismo en comunicación de fluido con la cámara 6 a través del tubo 15. Una válvula 16 controla el flujo de dióxido de carbono y de antígeno a través del tubo 15. Un medio de calefacción (no mostrado) está dispuesto debajo de la cámara 6. Dentro de la cámara 6 se encuentra una paleta rotable 17, la cual puede ser accionada para mezclar el anticuerpo y la sangre dentro de la cámara 6. Un dispositivo de temporización (no mostrado) controla un

ES 2 330 190 T3

periodo de incubación cuando el anticuerpo y la sangre permanecen dentro de la cámara 6. El tiempo de incubación que resta puede ser mostrado sobre la pantalla 18 del panel de control.

Un recipiente de almacenaje de salida, a saber una bolsa de sangre de salida 19 está así mismo colgada del dispositivo 1 y está interconectada con la cámara 6 a través de un tubo 20. El tubo 20 pasa a través de un sellador térmico 21, el cual puede ser accionado para sellar el tubo 20 y, con ello, la bolsa de la sangre de salida 19. Una bomba peristáltica adicional (no mostrada) se dispone para bombear el contenido de la cámara 6 hasta el interior de la bolsa de sangre de salida 19.

La cámara 6 junto con los tubos 7, 20 y la bolsa de sangre de salida 19 son elementos desechables que son inutilizados después de cada procedimiento.

En funcionamiento, el usuario inserta dentro del dispositivo 1 una bolsa de sangre de salida 19, una cámara 6 y un tubo 7, 20. Se hace pasar el tubo 20 a través del sellador térmico 21 y de la bomba peristáltica. El tubo 7 se hace pasar a través de la otra bomba peristáltica y de la celda de flujo de contador Coulter 9. El usuario inserta así mismo la bolsa de sangre 4 que contiene la sangre de un paciente y la fija al tubo 7. Además de lo expuesto el usuario fija el tubo 15 de la cámara 6 al filtro estéril 13. El usuario a continuación cierra el panel frontal 3 de la carcasa 2 y pone en marcha el dispositivo 1 utilizando el teclado 22 del dispositivo.

El dispositivo 1 automáticamente pesa la bolsa de sangre de entrada 4. El peso de la bolsa de sangre de entrada 4 es enviado automáticamente a un sistema informático central (no mostrado) situado dentro del dispositivo 1. A partir del peso de la bolsa de sangre de entrada 4 el sistema informático puede determinar el volumen de sangre existente en la bolsa 4. La bomba peristáltica a continuación aspira la sangre desde la bolsa de entrada de sangre 4 a través del tubo 7. La sangre fluye a través de la ventana transparente 8 del tubo 7 y el contador Coulter 9 determina la concentración de células que pasa a través del tubo 7. El contador Coulter envía una señal dirigida al sistema informático central. El sistema informático central determina, a partir del volumen de sangre calculado y de la concentración de células, el volumen correcto de anticuerpos que necesita ser inyectado dentro de la cámara 6 mediante una o más de las jeringas 10, 11. La bomba peristáltica continúa bombeando la sangre desde la bolsa 4 hasta que se recibe una señal del sistema informático central, el cual detiene la bomba. La señal procedente del sistema informático central es enviada en respuesta a una señal procedente del contador Coulter 9 hasta el sistema informático central, señal que es enviada cuando el contador Coulter 9 detecta que no hay más células que pasen por la ventana 8.

A continuación, el sistema informático central señala al motor paso a paso (no mostrado) fijado a las jeringas 10, 11 que aprieten una o más de las jeringas 10, 11 para que administren el volumen calculado de anticuerpo en el interior de la cámara 6 a través del tubo 15.

A continuación, el dispositivo, de manera opcional, introduce dióxido de carbono a través del orificio de entrada 14 de dióxido de carbono mediante la apertura de la válvula 16 (siendo el mecanismo de apertura y cierre de la válvula 16 susceptible de ser controlado por el sistema informático central). La cantidad de dióxido de carbono que debe ser añadida se calcula por el sistema informático central en base al volumen de aire conocido en la cámara 6, el tubo 7, 20 y la bolsa de sangre de salida 19 y del volumen de sangre calculado a partir de la bolsa de sangre de entrada. La concentración final de dióxido de carbono existente en la cámara 6 se establece, de modo aproximado, 5%. El dióxido de carbono es introducido en la cámara 6 a través del tubo 15. El dióxido de carbono, de esta forma, purga cualquier anticuerpo que permanezca en el tubo 15, asegurando de esta manera que todo el anticuerpo liberado es añadido a la cámara 6. La bolsa de sangre de entrada 4, una vez vacía, actúa como una vejiga de aire para alojar el volumen de gas adicional después de la introducción del dióxido de carbono.

El dispositivo, puede así mismo, comprender un calentador (no mostrado), bajo el control del sistema informático central, calentador que es situado por debajo de la cámara 6 y controla la temperatura de la cámara 6 hasta entre 25 y 37°C. Un termostato conectado al calentador impide el sobre o infracalentamiento.

La sangre y el agente anticuerpo son entonces incubados en la cámara 6 durante un periodo predeterminado. Convenientemente, el periodo de incubación no excede las 24 horas y, de modo preferente, es de entre 4 a 8 horas. El tiempo seleccionado debe ser suficiente para permitir que tenga lugar la reacción de retrodiferenciación.

Durante la incubación los brazos de pala 17 rotan lentamente para producir la mezcla del anticuerpo y la sangre.

Tras la conclusión del periodo de incubación, los brazos de pala 17 continúan girando y actúan de forma eficaz como brazos raspadores para desalojar cualquier célula fijada a la superficie de la cámara 6 y con ello facilitar la recogida de las células. La bomba peristáltica aspira el contenido de la cámara 6 (esto es, la sangre que contiene células indiferenciadas, esto es, células madre) desde el fondo de la cámara 6 para introducirla en la bolsa de sangre de salida 19. La bomba continúa bombeando hasta que un volumen de sangre medido (de acuerdo con lo determinado por el uso de una bomba peristáltica calibrada) ha entrado en la bolsa de sangre de salida 19.

Finalmente, el sellador térmico 21 aprieta el tubo 20 y provoca que sea sellada una extensión de, de manera aproximada, 2 cm del tubo 20, y a continuación el sellador 21 corta el tubo 20 aproximadamente en la posición central del sello.

El dispositivo 1 puede entonces advertir al usuario que el proceso se ha completado.

El usuario puede entonces retirar la bolsa de sangre de salida 19. La cámara 6 junto con el tubo 7, 20 y la bolsa de sangre de entrada 4 puede ser desechadas.

La bolsa de sangre de salida 19 puede, si es necesario, ser transferida a un sistema de purificación, por ejemplo a un sistema para identificar las células que incorporan unos marcadores de superficie celular característicos de las células indiferenciadas, aunque también pueden ser utilizados como guía las modificaciones morfológicas. El sistema de purificación puede ser utilizado para retirar el agente anticuerpo y/o, de manera opcional, enriquecer las células (madre) indiferenciadas. Un sistema de purificación apropiado es el sistema de purificación CliniMACs/Isolex.

II. Células indiferenciadas y celdas diferenciadas

Hay muchas células indiferenciadas y células diferenciadas que se encuentran *in vivo* y la técnica general está repleta de información acerca de ellas.

A modo de ejemplo, con respecto a las células de los linajes de células hematopoyéticas, puede hacerse referencia, *inter alia* a los trabajos de Levitt y Mertelsman 1995 (Células Madre Hematopoyéticas [Haematopoietic Stem Cells], publicado por Marcel Dekker Inc-especialmente las páginas 45-59) y Roitt *et al.* (Inmunología [Immunology], 4ª Edición, Eds. Roitt, Brostoff y Male 1996, Ed. por Mosby-especialmente la Capítulo 10).

Una célula indiferenciada es una célula inmadura que no muestra un carácter diferenciado maduro pero que es capaz de desarrollar una prole que sí lo hace. Un ejemplo bien conocido de una célula indiferenciada es una célula madre.

Las células madre son células inmaduras indiferenciadas, capaces de autorrenovación (división sin límite) y diferenciación (especialización). Estas células juveniles son abundantes en un embrión en desarrollo; sin embargo, el número de ellas se reduce a medida que el desarrollo avanza. Por el contrario, un organismo adulto contiene un número limitado de células madre que están confinadas en determinados compartimentos del cuerpo.

Se cree en general que las células madre son, o bien monopotentes, bipotentes o pluripotentes. Las células madre monopotentes y bipotentes están más restringidas en cuanto a su desarrollo y originan, respectivamente, uno o dos tipos de células especializadas. Por el contrario, las células madre pluripotentes (PSCs) pueden diferenciarse en muchos tipos diferentes de células, originando tejidos (los cuales constituyen órganos) o, en el caso de células madre totipotentes, el completo organismo. Las células madre pluripotentes a diferencia de las monopotentes o bipotentes son capaces de diferenciación en múltiples linajes originando un tejido que estaría compuesto de un conjunto de células de diferentes tipos o linajes.

La Célula Madre Hematopoyética es un ejemplo de célula madre pluripotente que se encuentra entre las células medulares y originan todas las diferentes células sanguíneas (incluyendo los leucocitos y los eritrocitos).

La sangre es un tejido fluido, compuesto por Linfocitos (Li), Monocitos (Mo), Neutrófilos (Ne), Basófilos (Ba), Eosinófilos (Eso), Plaquetas (Pl) y Glóbulos Rojos (Rbc)-véase la Figura 3. Este tejido especializado es fabricado por la diferenciación de las Células Madre Hematopoyéticas (Hsc). En general, los glóbulos blancos (dentro del círculo mayor) combaten las infecciones mientras que los glóbulos rojos (dentro del círculo más pequeño) transportan nutrientes, oxígeno y productos de desecho por todo él.

Previamente las células madre hematopoyéticas fueron extraídas mediante aislamiento de i) la médula ósea, ii) la sangre periférica movilizada por el factor de crecimiento o iii) la sangre del cordón umbilical (placenta). Recientemente, las células madre hematopoyéticas han sido preparadas a partir de células madre embrionicas (ES), las cuales se extraen de embriones obtenidos utilizando técnicas de fertilización *in vitro*. Estas células indiferenciadas son capaces de diferenciación y reconstitución multilínea de todo el tejido corporal, esto es, son totipotentes.

Los procedimientos de extracción mencionado en las líneas anteriores son engorrosos, algunas veces peligrosos y en determinados casos pueden ser considerados no éticos, especialmente en el caso del procedimiento de extracción de células madre embrionicas.

Hay una pluralidad de células madre diferenciadas del linaje hematopoyético. Estas incluyen células madre pluripotentes (PSCs) células madre linfoides (LSCs) y células madres mieloideas (MSCs), conocidas colectivamente como células progenitoras linfohematopoyéticas (LPCs).

Las LSCs y MSCs están constituidas mediante la diferenciación de las PSCs. De ahí que las LSCs y MSCs estén más comprometidas que las PSCs.

Ejemplos de células diferenciadas del linaje hematopoyético incluyen las células T, las células B, los eosinófilos, los basófilos, los neutrófilos, los megacariocitos, los monocitos, los eritrocitos, los granulocitos, los mastocitos y los linfocitos.

ES 2 330 190 T3

Las células T y las células B están constituidas mediante la diferenciación de las LSCc. De ahí que las células T y las células B estén más comprometidas que las LSCs. Más detalladamente, la cadena de diferenciación es ISC -> célula pro B o protimocito. Célula pro B -> célula pre B -> célula madura B -> célula plasmática. Protimocito -> trimocito común -> trimocitos maduros (linajes cooperadores/inductores o citotóxicos/supresores)-véase la Figura 4.

Las células Eosinófilas, basófilas, neutrófilas, los megacariocitos, los monocitos, los eritrocitos, los granulocitos, los monocitos los NKs, y los linfocitos, están constituidos mediante la diferenciación de las MSCs. De ahí que cada una de las células estén más comprometidas que las MSCs. Más detalladamente, la cadena de diferenciación es MSC -> megacarioblasto imaduro (-> megacarioblasto -> megacariocito -> plaqueta) o proeritroblasto (-> eritroblasto -> reticulocito -> eritrocito) o célula madre mielomonocítica, una célula madre bipotente que se diferencia en, o bien un mieloblasto (-> promielocito -> mielocito -> granulocito) o en un monoblasto (-> promonocito -> monocito -> macrófago)-véase la Figura 5.

Las vías de diferenciación de la hematopoyesis han sido, por tanto, caracterizadas ampliamente y las diversas etapas celulares son fácilmente identificables de acuerdo con la morfología y los marcadores de superficie celular de linaje específico (véase más abajo).

Otras células madre incluyen células madre neurales, células madre multipotentes que pueden generar neuronas, atrociitos y oligodendrocitos (Nakafuku y Nakamura 1995, J. Neurosci Res., vol 41(2): 153-68; Anderson, 1994, FA-SEB J., vol 8(10): 707-13; Morshead *et al.*, 1994, Neuron, Vol. 13(5): 1071-82). Las células satélites de los músculos del esqueleto son otro tipo de célula madre, más concretamente una clase diferenciada de células miogénicas que se mantienen como células madre inactivas en el adulto y originan nuevas células musculares cuando es necesario (Bischoff, 1986, Dev Biol., vol 115(1): 129-39). Otros tipos de células madre son las células madre epiteliales, un subconjunto de células basales, células madre endodérmicas y células madre mesenquimatosas.

Un tipo muy importante de células madre es el de las células madre embrionicas (ES). Estas células han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas. Efectivamente, las células ES son sistemáticamente utilizadas en la producción de animales transgénicos. Las células ES han sido mostradas en *differentiate in vitro* en diversos tipos de células incluyendo los precursores linfoides (Potocnik *et al.*, 1994, EMBO J., vol. 13(22): 5274-83) y células neurales. Los documentos US 5,843,780 y US 6,200,806 divulgan el aislamiento de células ES de los primates. Las células ES se caracterizan por una pluralidad de marcadores de etapa específica, como por ejemplo los marcadores embrionarios de etapa específica 3 y 4 (SSEA-3 y SSEA-4), glucoproteínas de peso molecular alto TRA-1-60 y TRA-1-81 y fosfatasa alcalina (Andrews *et al.*, 1984, Hybridoma, vol. 3: 347-361; Kannagi *et al.*, 1983, EMBO J., vol. 2:2355-2361; Fox *et al.*, 1984, Dev. Biol., vol. 103: 263-266; Ozawa *et al.*, 1985, Cell. Differ., vol. 16: 169-173).

Diversos antígenos están asociados con células indiferenciadas y diferenciadas. El término “asociados” se refiere aquí a células que expresan o que son capaces de expresar o presentar, o que son capaces de ser inducidas a presentar, o que comprenden, el (los) respectivo (s) antígeno (s).

La mayoría de las células indiferenciadas y de las células diferenciadas comprenden antígenos de Clase I y/o de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Si estos antígenos están asociados con aquellas células se denominan células de Clase I⁺ y/o de Clase II⁺.

Cada antígeno específico asociado con una célula indiferenciada o con una célula diferenciada puede actuar como marcador. De ahí que diferentes tipos de células puedan ser distinguidos entre sí sobre la base de su (s) antígeno (s) concreto (s) asociado (s) o sobre la base de una combinación particular de antígenos asociados.

Ejemplos de estos antígenos marcadores incluyen antígenos CD34, CD19, y CD3. Si estos antígenos están presentes, entonces estas concretas células se llaman, respectivamente, células CD34⁺, CD19⁺ y CD3⁺. Si estos antígenos no están presentes, entonces las células se llaman, respectivamente, células CD34⁻, CD19⁻ y CD3⁻.

Más detalladamente, las células PSCs son CD34⁺, DR⁻, TdT⁻ (siendo otros marcadores útiles CD38⁻ y CD36⁺). Las células LSCs son DR⁺, CD34⁺ y TdT⁺ (también CD38⁺). Las células MSCs son CD34⁻, DR⁺, CD13⁻, CD33⁺, CD7⁺, y TdT⁺. Las células B son CD19⁺, CD21⁺, CD22⁺ y DR⁻. Las células T son CD2⁺, CD3⁺, y, o bien CD4⁺ o bien CD8⁺. Los linfocitos inmaduros son células CD4⁺ y CD8⁺. Las células activadas T son células DR⁺. Los linfocitos citolíticos naturales son células CD56⁺ y CD16⁺. Los linfocitos T son células CD7⁺. Los leucocitos son células CD45⁻. Los granulocitos CD13⁺ y CD33⁺. Las células macrófagos monolíticas son CD14⁻ y DR⁺. Detalles adicionales se ofrecen en las Figuras 4 y 5.

Las células madre embrionicas expresan el SSEA-3 y el SSEA-4, las glicoproteínas de alto peso molecular TRA-1-60 y TRA-1-81 y la fosfatasa alcalina. Tampoco expresan el SSEA-1 cuya presencia es un indicador de diferenciación. Otros marcadores son conocidos para otros tipos de células madre, como por ejemplo el Nestin para células madre neuroepiteliales (J. Neurosci, 1985, Vol. 5: 3310). Las células madre mesenquimatosas son positivas para los SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a y CD124, por ejemplo, y negativas para los CD34, CD45 y CD14.

Como alternativa, o además de, muchas células pueden ser identificadas mediante características morfológicas. La identificación de las células utilizando microscopía, de modo opcional con técnicas de tinción, es una rama muy desarrollada de la ciencia histológica y los conocimientos relevantes son ampliamente conocidos en la técnica. La

tinción clara de las células se llevará únicamente a cabo en partes de las células para confirmar la identidad, dado que las tinciones en general provocan la muerte de la célula.

De ahí que, buscando la presencia de los marcadores antigénicos anteriormente relacionados es posible identificar ciertos tipos de células (por ejemplo si una célula es o no una célula indiferenciada o una célula diferenciada) y la especialización del tipo de célula (por ejemplo si esa célula es una célula T o una célula B).

Las células indiferenciadas pueden comprender cualquier componente que esté relacionado con la presentación, captura o reconocimiento de antígenos. De modo preferente, la célula indiferenciada es una célula de Clase I⁺ del MHC y/o una célula de Clase II⁺ del MHC.

La célula más comprometida puede comprender cualquier componente que esté relacionado con la presentación, captura o reconocimiento de antígenos. De modo preferente, la célula más comprometida es una célula de Clase I⁺ del MHC y/o una célula de Clase II⁺ del MHC.

La célula más comprometida es cualquier célula derivada o derivable de una célula indiferenciada. Así, en una forma de realización preferente, la célula más comprometida es también una célula indiferenciada. A modo de ejemplo, por consiguiente, la célula más comprometida indiferenciada puede ser una célula madre linfocítica o una célula madre mieloide, y la célula indiferenciada es una célula madre pluripotente.

En otro ejemplo preferente, la célula más comprometida, es una célula diferenciada, como por ejemplo una célula CFC-T, una célula CFC-B, una célula CFC-Eosina, una célula CFC-Bas, una célula CFC-GM, una célula CFC-MEG, una célula BFC-E, una célula CFC-E, una célula T, una célula B, un eosinófilo, un basófilo, un neutrófilo, un monocito, un megacariocito o un eritrocito; y una célula indiferenciada es una célula madre mieloide, una célula madre linfocítica, o una célula madre pluripotente.

Si la célula madre más comprometida es una célula diferenciada, entonces, de modo preferente, la célula diferenciada es un linfocito B (activado o no activado), un linfocito T (activado o no activado), una célula procedente del linaje de monocitos macrófagos, una célula nucleada capaz de expresar los antígenos de clase I o clase II, o una célula que puede ser inducida a expresar antígenos de clase I o de clase II o una célula desnucleada (esto es, una célula que no contiene un núcleo-como por ejemplo un glóbulo rojo).

En ejemplos alternativos preferentes, la célula diferenciada se selecciona entre cualquiera entre un grupo de células que comprende linfocitos granulados grandes, linfocitos nulos y linfocitos citotóxicos naturales, expresando cada uno los receptores de la superficie celular CD56 y/o CD16.

La célula diferenciada puede incluso constituirse mediante la nucleización de una célula desnucleada.

III. Agentes

El agente conecta de forma activa con la célula más comprometida con el fin de retrodiferenciar esa célula en una célula indiferenciada. En este sentido, el agente de la retrodiferenciación de la célula más comprometida en la célula indiferenciada puede actuar en conexión directa o en conexión indirecta con la célula más comprometida.

El agente puede actuar de manera intracelular dentro de la célula más comprometida. Sin embargo, de modo preferente, el agente actúa de manera extracelular respecto de la célula más comprometida.

Un ejemplo de conexión directa es cuando la célula más comprometida tiene al menos un receptor de superficie celular sobre su superficie celular, como por ejemplo una cadena β que presenta regiones homólogas (regiones que habitualmente se encuentra que tienen la misma secuencia o una secuencia similar) como por ejemplo las que pueden encontrarse en células B, y en las que el agente conecta directamente con el receptor de la superficie celular. Otro ejemplo, es cuando la célula más comprometida tiene un receptor de superficie celular sobre su superficie celular, como por ejemplo una cadena α que presenta regiones homólogas como las que pueden encontrarse en las células T, y en las que el agente directamente conecta con el receptor de la superficie de la célula.

Un ejemplo de conexión indirecta es cuando la célula más comprometida tiene al menos dos receptores de superficie celular sobre su superficie celular y la conexión del agente con uno de los receptores afecta al otro receptor el cual entonces induce la retrodiferenciación de la célula más comprometida.

El agente de la retrodiferenciación de la célula más comprometida en una célula indiferenciada puede ser un compuesto o una composición química. De modo preferente, sin embargo, el agente es capaz de conectar con un receptor de superficie celular situado sobre la superficie de la célula más comprometida. De esta forma, en un ejemplo preferente, el agente conecta de modo activo con un receptor presente sobre la superficie de la célula más comprometida-receptor que puede expresarse mediante la célula más comprometida, como por ejemplo un receptor que sea capaz de ser expresado mediante la célula más comprometida.

Por ejemplo, los agentes preferentes incluyen cualquiera u otros entre el monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), una molécula CD4, una molécula CD8, una parte o todo de un receptor de células T, un ligando (fijo o libre), un

péptido, un receptor de células T (TCR), un anticuerpo, un anticuerpo reactivo cruzado, un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo monoclonal. También pueden utilizarse factores de crecimiento, como por ejemplo factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo la eritropoyetina y el factor de estimulación de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF).

Si el agente es un anticuerpo, un anticuerpo reactivo cruzado, un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo policlonal, entonces, de modo preferente, el agente es cualquiera u otros en un anticuerpo, un anticuerpo reactivo cruzado, un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo policlonal, o cualquiera u otros entre: la cadena β de un antígeno de clase II del MHC, la cadena β de un antígeno HLA-DR, del MHC, la cadena α de un antígeno de clase I o clase II del MHC, la cadena α del antígeno HLA-DR, la cadena α y la cadena β del antígeno de clase II del MHC o un antígeno de clase I del MHC. Un ejemplo de anticuerpo apropiado es el CD3/43 (suministrado por Dako).

El término “anticuerpo” incluye los diversos fragmentos (ya sea derivados de una tecnología recombinante o de escisión proteolítica) y derivados que retienen una actividad de enlace, como por ejemplo los anticuerpos Fab, F(ab')₂ y anticuerpos scFv, así como miméticos o bioisómeros de éstos. También incluidos como anticuerpos son las variantes genomanipuladas cuando algunas de las secuencias de los aminoácidos han sido modificadas, por ejemplo mediante la sustitución de los residuos de los aminoácidos para potenciar el enlace, o cuando se han fabricado anticuerpos de una especie diferente al organismo cuyas células se desean tratar de acuerdo con los procedimientos de la invención, para reducir la posibilidad de reacciones inmunológicas negativas (un ejemplo de esto son los anticuerpos monoclonales de ratón “humanizados”).

Los agentes utilizados para llevar a cabo la conversión de una célula más comprometida en una célula indiferenciada, de modo preferente actúan de forma extracelular respecto de la célula más comprometida. En particular, es preferente que la célula más comprometida comprenda un receptor que pueda ser conectado de forma activa por el agente y el agente conecte de forma activa con el receptor.

Por ejemplo, el receptor puede ser un receptor de superficie celular. Ejemplos específicos de receptores de superficie celular incluyen los receptores de clase I y clase II del MHC. De modo preferente, el receptor comprende un componente α y/o un componente β , como es el caso de los receptores de clase I y clase II del MHC.

De modo más preferente, el receptor comprende una cadena β que presenta regiones homólogas, por ejemplo al menos las regiones homólogas de la cadena β del HLA-DR.

Como alternativa, o además de, el receptor comprende una cadena α que presenta regiones homólogas, por ejemplo al menos las regiones homólogas de una cadena α del HLA-DR.

De modo preferente el receptor es un antígeno de Clase I o de Clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En formas de realización preferentes el receptor de la superficie celular es cualquiera entre: un receptor del HLA-DR, un receptor del DM, un receptor del DP, un receptor del DQ, un receptor del HLA-A, un receptor del HLA-B, un receptor del HLA-C, un receptor del HLA-E, un receptor del HLA-F, o un receptor del HLA-G. En formas de realización más preferentes, el receptor de la superficie celular es un receptor del HLA-DR.

De modo preferente, el agente es un anticuerpo frente al receptor, de modo más preferente, el agente es un anticuerpo monoclonal frente al receptor.

Otro ejemplo preferente de un agente es uno que modula la expresión génica del MHC, como por ejemplo la expresión de la clase I⁺ del MHC y/o de la clase II⁺ del MHC.

En un ejemplo preferente, el agente es utilizado en combinación con un modificador de la respuesta biológica. Ejemplos de modificadores de la respuesta biológica incluyen un agente alcalinizante, un inmunomodulador, un factor de crecimiento, una citocina, un receptor de la superficie celular, una hormona, un ácido nucleico, una secuencia nucleotídica, un antígeno o un péptido. Un agente alcalinizante preferente es o comprende la ciclofosfoamida.

Otros modificadores de la respuesta biológica preferentes incluyen compuestos capaces de aumentar la expresión antigénica de la clase I y/o de la clase II del MHC. En una forma de realización preferente, esto es así para permitir que un agente que se fije a un receptor del MHC funcione de una forma más eficaz.

Dado que puede hacerse que todo tipo de células expresen los antígenos de clase I y/o de clase II del MHC, ello debe ofrecer un procedimiento para la retrodiferenciación de una amplia variedad de tipos de células ya expresen constitutivamente o no los antígenos del MHC de la clase I y/o de la clase II.

IV. Procedimientos de retrodiferenciación de las células

En los procedimientos también descritos en la presente memoria, una población de células que comprenda células comprometidas es situada en contacto con un agente que conecta de forma activa con una o más células comprometidas de la población. La población de células es a continuación incubada para permitir que esas células que han sido conectadas de forma activa por el agente progresen a lo largo del proceso de retrodiferenciación y, en último término, se conviertan en indiferenciadas.

De modo preferente, la etapa de contacto comprende la conexión del agente con cualquiera u otros entre los siguientes: regiones homólogas de la cadena α de los antígenos de clase I, regiones homólogas de la cadena α de los antígenos de clase II, un receptor de la superficie celular CD4, un receptor de la superficie celular CD8, regiones homólogas de la cadena β de antígenos de clase II en presencia de linfocitos, regiones homólogas de la cadena α de antígenos de clase I en presencia de linfocitos, o regiones homólogas de la cadena α de antígenos de clase II en presencia de linfocitos. De modo preferente, la etapa de contacto se produce en presencia del modificador de la respuesta biológica (véase *supra*).

Típicamente, la población de células se deriva de una muestra biológica, como por ejemplo sangre o tejidos relacionados incluyendo la médula ósea, tejido neuronal procedente del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico, tejido muscular, o tejido epidérmico y/o dérmico a partir de la piel (esto es, mediante, por ejemplo, raspado bucal). De modo preferente el material biológico es de origen posnatal. Es preferente utilizar sangre o productos elaborados de ésta, como por ejemplo plasma o la capa leucocítica, dado que su retirada de las personas puede llevarse a cabo con el mínimo de supervisión médica. Las muestras de sangre son típicamente tratadas con anticoagulantes, como por ejemplo heparina o citrato. Las células de la muestra biológica pueden ser tratadas para enriquecer determinados tipos de células, eliminar determinados tipos de células o disociar células de una masa de tejido. Procedimientos útiles para purificar y separar células incluyen la centrifugación (como por ejemplo la centrifugación sobre gradiente de densidades), la citometría de flujo y la cromatografía de afinidad (como por ejemplo el uso de microesferas magnéticas que comprendan anticuerpos monoclonales sobre marcadores de la superficie celular o panoramización) (véase Vettese-Dadey, The Scientist (13 Sep. 1999) 13 (18): 21). A modo de ejemplo, la separación Ficoll-Hypaque es útil para suprimir eritrocitos y granulocitos para dejar células mononucleares, como por ejemplo linfocitos y monocitos.

Dado que las células son esencialmente cultivos primarios, puede ser necesario complementar las poblaciones de células con nutrientes apropiados para mantener la viabilidad. Las condiciones de cultivo apropiadas son conocidas por la persona experta en la materia. No obstante, el tratamiento de poblaciones de células se inicia, de modo preferente, lo más pronto posible después de la retirada de los pacientes de las muestras biológicas, típicamente dentro de las 12 horas, de modo preferente de 2 a 4 horas. La viabilidad de las células puede ser verificada utilizando técnicas bien conocidas, como por ejemplo exclusión del azul de tripano.

Las poblaciones de células son generalmente incubadas con un agente durante al menos dos horas, típicamente entre 2 y 24 horas, de modo preferente entre 2 y 12 horas. Las incubaciones se llevan típicamente a cabo a, desde aproximadamente la temperatura ambiente, por ejemplo, de modo aproximado, 22°C hasta, de modo aproximado, a 37°C incluyendo a 33°C. El progreso del procedimiento de retrodiferenciación puede ser verificado periódicamente retirando una pequeña parte de la muestra y examinando las células utilizando microscopía y/o citometría de flujo. Como alternativa, el dispositivo puede comprender un medio de rastreo para un control en línea del progreso del procedimiento de retrodiferenciación.

Una vez que los números relativos del tipo de célula deseado se han incrementado hasta un nivel pertinente, el cual puede, por ejemplo, ser tan bajo como del 0,1% o tan alto como del 5%, las poblaciones de células alteradas resultantes pueden ser utilizadas de múltiples formas. Con respecto a los números de las células indiferenciadas constituidas, es importante apreciar la capacidad proliferativa de las células madre. Aunque bajo alguna circunstancia, los números de las células madre u otras células indiferenciadas constituidas puede parecer bajo, los estudios han mostrado que solo 50 células madre hematopoyéticas pluripotentes pueden reconstituir un entero sistema hematopoyético de un ratón donante. Por tanto, la utilidad terapéutica no requiere la formación de un gran número de células.

La conversión de células más comprometidas en células diferenciadas puede así mismo llevarse a cabo *in vivo* mediante la administración del agente, unida con un portador o diluyente, a un paciente. Sin embargo, es preferente en muchos casos que la retrodiferenciación se lleven a cabo *in vitro/ex vivo*.

Las poblaciones de células tratadas obtenidas *in vitro* pueden ser a continuación utilizadas con un procesamiento mínimo. Por ejemplo, pueden ser simplemente combinadas con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y administradas a un paciente necesitado de células madre.

Puede, sin embargo, ser deseable enriquecer la población de células para células indiferenciadas o purificar las células respecto de la población de células. Esto puede convenientemente llevarse a cabo utilizando una pluralidad de procedimientos (véase Vettese-Dadey-The Scientist 13 (18): 21 Sep. 1999). Un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede, de modo opcional, comprender unos medios de purificación o aislamiento para enriquecer dichas células indiferenciadas o recuperar dichas células indiferenciadas respecto de la población de células alteradas. Por ejemplo, las células pueden ser purificadas sobre la base de los marcadores de la superficie celular utilizando cromatografía y/o citometría de flujo. No obstante, a menudo no será ni necesario ni deseable purificar de forma extensiva células indiferenciadas respecto de la población celular, dado que otras células presentes en la población (por ejemplo células estromales) pueden mantener la viabilidad y la función de las células madre.

La citometría de flujo es una técnica bien establecida, fiable y potente de caracterización de células dentro de poblaciones mixtas así como para la clasificación de células. Así, los medios de purificación o aislamiento pueden comprender un citómetro de flujo. El citómetro de flujo actúa sobre la base de las características físicas de las partículas en suspensión líquida, las cuales pueden ser distinguidas cuando son interrogadas con un haz de luz. Dichas partículas pueden, por supuesto, ser células. Las características físicas incluyen el tamaño y la estructura de las células o, como

se ha puesto de moda en los últimos años, los marcadores de la superficie celular enlazados mediante anticuerpos monoclonales conjugados con moléculas fluorescentes.

5 Kreisseg *et al.*, 1994, J. Hematother 3 (4): 263-89, declaran "Debido a la viabilidad de los anticuerpos monoclonales anti CD34", la citometría de flujo de parámetros múltiples se ha convertido en la herramienta prioritaria para la determinación de las células madre y progenitoras hematopoyéticas" y continúan describiendo las técnicas generales de cuantificación y caracterización de las células de expresión del CD34 mediante citometría de flujo. Así mismo, Korbling *et al.*, 1994, Bone Marrow Transplant ["Transplante de Médula Ósea"], 13: 649-54, da a conocer la purificación de las células CD34⁺ mediante inmuoadsorción seguida por citometría de flujo en base a la expresión del HLA-DR. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el CD34⁺ es un marcador útil en conexión con las células madre/progenitoras.

15 Pueden así mismo ser utilizadas las técnicas de citometría de flujo para la clasificación de las células madre en base a otras características físicas. Por ejemplo, Visser *et al.*, 1980, Blood Cells ["Células Sanguíneas"] 6: 391-407 dan a conocer que las células madre pueden ser aisladas sobre la base de su tamaño y grado de estructuralidad. Grogan *et al.*, 1980, Blood Cells ["Células Sanguíneas"], 6: 625-44 enseñan también que las células madre viables pueden ser clasificadas a partir de tejidos hematopoyéticos simples con una pureza elevada y verificable.

20 Lo mismo que pueden seleccionarse las células sobre la base de la presencia de un marcador de la superficie celular u otra propiedad física (selección positiva), las poblaciones celulares pueden ser enriquecidas, purificadas, utilizando criterios negativos. Por ejemplo, las células que poseen unos marcadores específicos de linaje como por ejemplo el CD4, CD8, CD42 y CD3 pueden ser retirados de la población celular mediante citometría de flujo o cromatografía de afinidad.

25 Una técnica muy útil para purificar células conlleva la utilización de anticuerpos u otros ligantes de afinidad enlazados con microesferas magnéticas. Las microesferas son incubadas con la población celular y las células que tienen un marcador de la superficie celular, como por ejemplo el CD34, al que se unen los ligando de afinidad, son capturadas. El tubo de muestra que contiene las células es situado en un concentrador magnético de muestras donde las microesferas son atraídas hacia los lados del tubo. Después de una o más etapas de lavado, las células de interés han sido parcial o sustancialmente purificadas modo completo de otras células. Cuando se utiliza en un formato de selección negativo, en lugar del lavado de las células unidas a las microesferas descartando la fase líquida, la fase líquida se mantiene y, en consecuencia, las células unidas a las microesferas son efectivamente retiradas de la población celular.

30 Estos procedimientos de purificación en base a ligandos de afinidad pueden ser utilizados con cualquier tipo de célula que haya sido caracterizada o pueda caracterizarse mediante los marcadores apropiados.

35 Urbankova *et al.*, 1996 (J. Chromatogr B Biomed Appl. 687: 449-52) da a conocer la micropreparación de células madre hematopoyéticas a partir de una suspensión de médula ósea de ratón mediante fraccionamiento del flujo del campo gravitacional. Urbankova *et al.*, 1996, comenta también que el procedimiento fue utilizado para la caracterización de células madre a partir de la médula ósea de ratón porque estas células son más grandes que las demás células de la médula ósea y, por consiguiente, es posible separarlas de la mezcla. Así, parámetros físicos distintivos de los marcadores de la superficie celular pueden ser utilizados para purificar/enriquecer células madre.

45 Las poblaciones de células que comprendan células indiferenciadas y células indiferenciadas purificadas obtenidas mediante los procedimientos de la invención pueden ser mantenidas *in vitro* utilizando técnicas conocidas. Típicamente, se utilizan medios de crecimiento mínimo, como por ejemplo el de Hanks, RPMI 1640, o los Medios Esenciales Mínimos de Dulbecco (DMEM) o el Medio Dulbecco Modificado de Iscove, complementados con suero de mamífero, como por ejemplo el FBS y, de modo opcional, plasma autólogo, para proporcionar un entorno de crecimiento apropiado para las células. En una forma de realización preferente, las células madre son cultivadas sobre capas nutricionales, como por ejemplo capas de células estromales (véase Deryugina *et al.*, 1993, Crit. Rev. Immunology, vol. 13: 115-150). Las células estromales se cree que segregan factores que mantienen las células progenitoras en un estado indiferenciado. Un sistema de cultivo a largo plazo de células madre se describe por Dexter *et al.*, 1977 (J. Cell Physiol, vol. 91: 335) y Dexter *et al.*, 1979 (Acta, Haematol., vol. 62: 299).

55 Por ejemplo, Lebkowski *et al.*, 1992 (Transplantation 53 (5): 1011-9) enseña que las células hematopoyéticas humanas CD34⁺ pueden ser purificadas utilizando una tecnología basada en el uso de anticuerpos monoclonales que son inmovilizados de forma covalente sobre superficies de poliestireno y que las células CD34⁺ purificadas mediante este proceso pueden ser mantenidas con una viabilidad superior al 85%. Lebkowski *et al.*, 1993 (J. Hematother, 2(3): 339-42) enseña también cómo aislar y cultivar células CD34⁺ humanas. Véase también Haylock *et al.*, 1994 (Immunomethods, vol. 5(3): 217-25) para un examen de diversos procedimientos.

60 La confirmación de la identidad de las células madre puede llevarse a cabo utilizando una pluralidad de ensayos *in vitro* como por ejemplo los ensayos de las CFC (véanse también los ejemplos). Células madre hematopoyéticas muy primitivas a menudo se miden utilizando el ensayo de células de iniciación de cultivo a largo plazo (LTC-IC) (Eaves *et al.*, 1991, J. Tiss. Cult. Meth. Vol 13: 55-62). Los LTC-ICs sostienen la hematopoyesis durante de 5 a 12 semanas.

65 Las poblaciones de células que comprendan células indiferenciadas y preparaciones purificadas que comprendan células indiferenciadas pueden ser congeladas para su uso futuro. En la técnica son conocidas técnicas apropiadas para congelar células y posteriormente hacerlas revivir. Un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede, de

modo opcional, comprender también un medio de congelación para congelar poblaciones de células que comprendan células indiferenciadas y/o preparaciones purificadas que comprendan células indiferenciadas.

- En un aspecto, de modo preferente, la retrodiferenciación se produce en células a partir de o en muestras de sangre de la capa leucocítica. El término “capa leucocítica” se refiere a la capa de leucocitos que se forma entre la capa de eritrocitos y el plasma cuando la sangre no coagulada es centrifugada o se deja reposar.

V. Desplazamiento de la relación de células diferenciadas normales en una población celular

- En el tejido normal el número relativo de los diversos tipos de células, incluyendo las células diferenciadas e indiferenciadas, en un momento dado, es generalmente constante. Por ejemplo, un recuento de leucocitos de una persona sana de 21 años sería de, de manera aproximada, 8×10^6 por ml, del cual el 27% corresponde a linfocitos, el 6% corresponde a monocitos y el 67% corresponde a granulocitos. El nivel de dichas células (incluyendo el recuento de células tanto del número relativo como del absoluto) resulta perturbado durante una enfermedad, como es el caso de la sangre leucémica de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL).

- El número relativo (esto es la relación) de células diferenciadas puede resultar perturbada, trastornada o desplazada, por ejemplo, en fracciones de células mononucleares estratificando la sangre o las capas leucocíticas sobre el histopaque para retirar los granulocitos, para llevar a cabo de esta manera la retrodiferenciación de las células diferenciadas en células indiferenciadas, células indiferenciadas que se autorrenovarán (proliferarán) y se rediferenciarán en una diversidad de tipos de células para reponer las células desplazadas.

- El número relativo (esto es la relación) de células diferenciadas puede así mismo resultar perturbada, alterada o desplazada en, por ejemplo, las capas leucocíticas (obtenidas a partir de donantes de sangre sanos) después de la retirada (mediante centrifugación sobre un medio gradiente de densidades o selección negativa utilizando microesferas magnéticas revestidas con anticuerpos) de glóbulos rojos, plaquetas, globulocitos, monocitos y linfocitos T. Este tratamiento puede denominarse selección negativa o enriquecimiento de un determinado tipo de célula diferenciada y es un ejemplo de tejido desplazado. Cuando dichas células son cultivadas, por ejemplo, en un medio con contenido en calcio, como por ejemplo el Medio Dulbecco Modificado de Iscove (ISDM), las células diferenciadas experimentarán una retrodiferenciación a células indiferenciadas, células indiferenciadas que se autorrenovarán (proliferarán) y se rediferenciarán en una diversidad de tipos de células para reponer las células desplazadas.

- Durante este proceso se aprecia que las células primeramente se aglomeran en colonias (experimentan agregación homocítica) con el fin de experimentar la retrodiferenciación. Una vez que las células más comprometidas se convierten en células indiferenciadas, adquieren la capacidad de proliferar y desarrollarse en una diversidad de tipos de células rediferenciadas, en un intento de reponer el número relativo de células desplazadas.

- Los medios de retrodiferenciación pueden llevarse a cabo para desplazar la relación de las células diferenciadas normales de una población de células incluyen anticuerpos (puros y conjugados, esto es unidos a ligandos fijos y libres, como por ejemplo microesferas magnéticas, de vidrio o de polistireno. Histopaque, LymphoPrep o cualquier medio gradiente de densidades utilizado para separar las células de acuerdo con la densidad de las células; o Dextran (capaz de provocar la sedimentación de, por ejemplo, los glóbulos rojos). Otros medios apropiados de retrodiferenciación pueden ser identificados en un análisis por Vettease-Dadey (véase The Scientist (13 Sep. 1999) 13 (18): 21).

- La exposición de las células desplazadas a un agente quelante apropiado, incluyendo el EDTA, el EGTA y la heparina, (agente quelante que puede ser designado como modificador de la respuesta biológica) puede provocar que incluso células más comprometidas se retrodiferencien en células indiferenciadas. Por ejemplo, la exposición de células desplazadas al EDTA durante un periodo de tiempo predeterminado seguida del cultivo de las células en un medio con contenido en calcio que contenga cortisona provocó que más células comprometidas se retrodiferenciaran en células indiferenciadas. Estas células, a su vez, se autorrenovaron y embarcaron en una senda de nueva diferenciación, originando progenitores eritroideos, como por ejemplo el eritroide unitario de formación por ráfagas (Eritroide BFU). Los progenitores eritroideos pueden ser cultivados y expandidos durante largos periodos de tiempo y pueden ser utilizados en el tratamiento de desórdenes de glóbulos rojos y de las carencias de glóbulos rojos.

- #### VI. Cambio de la concentración de iones libres de un medio que comprende una población de células

- La exposición de células diferenciadas a un agente quelante iónico, como por ejemplo el EGTA, durante un periodo determinado de tiempo seguida del cultivo de dichas células en un medio con contenido en calcio, como por ejemplo el IMDM que contenga hidrocortisona provoca que células más comprometidas se retrodiferencien en células indiferenciadas. Estas células, a su vez, se autorrenuevan y embarcan en una nueva senda de diferenciación originando progenitores megacariocíticos, como por ejemplo los megacariocitos unitarios de formación de colonias (Meg-CFU), lo que, en último término da lugar a las plaquetas.

VII. Procedimientos para recomprometer células indiferenciadas

- Una importante aplicación de las células indiferenciadas de la presente invención consiste en la reconstitución de tejidos, por ejemplo tejido nervioso o células hematopoyéticas. Esto conlleva la diferenciación de las células indiferenciadas obtenidas mediante los procedimientos de la invención. Esto puede llevarse a cabo simplemente administrando

las células indiferenciadas a un paciente, típicamente en un emplazamiento de interés, como por ejemplo la médula ósea, la médula espinal o el pulmón, y posibilitando que las condiciones psicológicas naturales del paciente efectúen la diferenciación. Un ejemplo específico de ello es la reconstitución o complementación del sistema hematopoyético, por ejemplo en el caso de pacientes con SIDA con un número reducido de linfocitos CD4⁺.

Como alternativa, la diferenciación (también designada en la presente memoria como recompromiso) puede llevarse a cabo *in vitro* y administrarse de forma terapéutica entonces las células expandidas. Esto se lleva generalmente a cabo mediante la administración de factores de crecimiento. Por ejemplo el ácido retinoico ha sido utilizado para diferenciar las células ES en células neuronales. Se ha utilizado la metilcelulosa seguido por el cocultivo con una línea estromal de médula ósea y el IL-7 se ha usado para diferenciar las células ES en precursores linfocíticos (Nisitani *et al.*, 1994, *Int. Immuno.*, vol 6(6): 909-916). Le Page (New Scientist 16 Diciembre 2000) enseña que las células ES pueden ser diferenciadas en células epiteliales pulmonares. Bischoff, 1986 (*Dev. Biol.*, vol 116(1): 129-39) enseña cómo diferenciar células satélite musculares en fibras musculares maduras. Las células precursoras neuronales pueden ser expandidas con el factor de crecimiento de fibroplastos básicos y con el factor de crecimiento epidérmico (Nakafuku y Nakamura, 1995 *J. Neurosci. Res.*, vol 41(2): 153-168). Las células hematopoyéticas pueden ser expandidas utilizando una pluralidad de factores de crecimiento incluyendo el GM-CSF, la eritropoyetina, el factor de células madre y las interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6) -véase Metcalf, 1989 (*Nature*, vol. 339: 27-30) para un análisis de estos diversos factores.

Potocnik *et al.*, 1994 (*EMBO J.*, vol. 13(22): 5274-83) incluso demostraron la diferenciación de las células ES en células hematopoyéticas utilizando condiciones de oxígeno bajas (5%).

Así, en un ejemplo preferente de la presente invención, la célula indiferenciada es a continuación comprometida en una célula recomprometida, como por ejemplo una célula diferenciada. La célula recomprometida puede ser del mismo linaje que la célula más comprometida a partir de la cual se derivó la célula indiferenciada. Como alternativa, la célula recomprometida puede ser de un linaje diferente a la célula más comprometida a partir de la cual se derivó la célula diferenciada. Por ejemplo, un linfocito B puede ser retrodiferenciado en una célula madre CD34⁺ CD38⁻, HLA-DR⁻. La célula madre puede ser a continuación recomprometida a lo largo de un linaje de células B (el mismo linaje) o de un linaje linfocítico (linaje diferente).

El compromiso de la célula indiferenciada en una célula recomprometida, como por ejemplo una célula diferenciada, puede efectuarse de diversas formas conocidas por el experto en la materia. Especialmente mediante el cultivo de las células indiferenciadas de una manera específica y en unos medios específicos, puede efectuarse la diferenciación en células seleccionadas.

Solo a modo de ejemplo, las células indiferenciadas pueden ser diferenciadas en miocitos cardíacos siguiendo el régimen de cultivo expuesto a continuación:

Día 1: hacer pasar las células indiferenciadas de densidad normal sobre una placa gelatinizada para liberar el cultivo de células fibroblásticas contaminantes.

Tripsinizar las células como para un paso normal hasta que las colonias despeguen. Manipular con suavidad con el fin de mantener los racimos de células conectadas holgadamente entre sí. A continuación emplatar directamente las células 1:3 en las fuentes Petri de calidad bacteriana en un medio de cultivo de células ES exentas de LIF (véase *infra*).

DÍA 3: Aspirar el medio cuidadosamente. Evitar succionar demasiados agregados. Añadir el nuevo medio.

Día 5: Aspirar como en el día 3 y sustituir el medio.

Día 7: Emplatar las células en un plato de calidad de cultivos de tejido de 24 ruedas.

Día 9: Cambiar la mitad del medio y mantener el batido.

Día 11: Cambiar la mitad del medio y mantener el batido.

A modo de ejemplo adicional, las células indiferenciadas pueden ser diferenciadas en neurogliocitos y neuronas siguiendo el procedimiento siguiente:

Día 1: Hacer pasar las células indiferenciadas con densidad normal sobre un plato gelatinizado para liberar el cultivo de fibroblastocitos.

Tripsinizar las células como para un paso normal hasta que las células despeguen. Manipular con suavidad con el fin de mantener conectados de manera holgada entre sí los racimos de células. A continuación directamente emplatar las células 1:3 en fuentes Petri de calidad bacteriana en un medio exento de LIF que contenga un 1 μ M de ácido retinoico (disponible en Sigma).

ES 2 330 190 T3

Día 3: Recoger los agregados de células y reemplatar en fuentes de cultivo de tejido (aproximadamente 25 agregados de células por 6 cm de fuente de cultivo de tejido) en un medio de cultivo de células ES sin LIF o RA. Aspirar el medio cuidadosamente.

Día 8: Cambiar la mitad del medio. A partir de este día, al menos un 10% de las células muestran fenotipos neuronales. Están específicamente teñidos de Trosol Violeta y son enérgicamente positivos para el antígeno N-CAM.

La persona experta en la materia será, sin duda, consciente de la existente de procedimientos apropiados para llevar a cabo el compromiso de una célula indiferenciada en cualquier célula diferenciada seleccionada.

La célula madre indiferenciada de la presente invención puede ser cultivada utilizando cualquier técnica rutinaria de cultivo de células madre embrionarias (ES). Solo a modo de ejemplo, un medio apropiado, para el cultivo de células indiferenciadas o ES se detalla a continuación.

Para preparar 100 ml de medio:

DMEM (GIBCO cat# 11965-062)	80 ml
FCS al 15%	15 ml
Pen / Estrep.	1 ml
L-Glutamina	1 ml
MEM aminoácidos no esenciales (GIBCO cat# 11140-050)	1 ml
Lif (10^5 U / ml)	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

El Lif se presenta en ampollas de 1 ml como LIF ESGRO AMRAD de 10^7 U/ml, este puede diluirse en 100 ml DMEM y un 10% de FCS ser almacenado en porciones de 5 ml a -20.

Con respecto al BME, puede añadirse 0,1 ml de BME (14,4 M) a 14,3 ml de PBS, filtrado mediante un acrodisco de 0,2 micrómetros, y ser almacenado a -20 durante hasta 1 mes.

Otro medio apropiado puede ser, por ejemplo, un medio de PMEF 100 ml del cual se prepara tal y como se detalla a continuación:

DMEM (GIBCO cat# 11965-062)	88 ml
FCS al 10%	10 ml
Pen / Estrep.	1 ml
L-Glutamina	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

Otros medios apropiados de cultivos de células ES resultarían fácilmente imaginables por parte de los expertos en la materia.

VIII. Ensayos para identificar agentes retrodiferenciantes

Además de los agentes mencionados con anterioridad, otros agentes apropiados pueden ser identificados utilizando los procedimientos de ensayo del documento WO 96/23870 o los de la presente invención. Con respecto a este último aspecto, en la presente memoria se describe también un procedimiento de identificación de una sustancia capaz de retrodiferenciar una célula comprometida/diferenciada en una célula indiferenciada, procedimiento que comprende la puesta en contacto de una población de células que comprende células comprometidas con una sustancia candidato y

la determinación de si hay un incremento en los números relativos de células indiferenciadas en dicha población de células, en el que dicha puesta en contacto se produce en presencia de una capa leucocítica.

Sustancias candidato apropiadas incluyen ligandos que se unen a receptores de la superficie celular, como por ejemplo productos anticuerpos (por ejemplo anticuerpos monoclonales y policlonales) anticuerpos monocatenarios, anticuerpos híbridos y anticuerpos de CDR injertada), como por ejemplo anticuerpos que ligan con receptores de la superficie celular. Receptores de la superficie celular de particular interés se describieron con anterioridad e incluyen receptores del MHC y proteínas de la superficie con designaciones CD, como por ejemplo CD4 y CD8. Otros ligandos que ligan con receptores de la superficie celular incluyen factores de crecimiento. Así mismo colecciones combinatorias, péptidos y miméticos péptidos, entidades químicas definidas, oligonucleótidos, y colecciones de productos naturales pueden ser objeto de examen colectivo para apreciar su actividad como agentes de retrodiferenciación. Las sustancias candidato pueden ser utilizadas en un examen inicial por tandas de, por ejemplo, 10 sustancias por reacción, y las sustancias de esas tandas que muestran inhibición pueden ser ensayadas individualmente.

Un ensayo típico comprende la colocación de una muestra de células que comprenda células comprometidas en un recipiente apropiado, como por ejemplo un plato multipocillo. Una sustancia candidato es añadida al pocillo y las células son incubadas en el pocillo. Las incubaciones son típicamente llevadas a cabo a, desde, de modo aproximado, una temperatura ambiente de, por ejemplo, de modo aproximado, 22°C hasta, de modo aproximado, 37°C, incluyendo 33°C.

La retrodiferenciación puede ser medida retirando una pequeña muestra de células y examinando las células mediante microscopia y/o citometría de flujo para determinar si se ha producido un cambio en los números de células indiferenciadas. Típicamente, la determinación de modificaciones en los números de células indiferenciadas se lleva a cabo mediante la vigilancia de los cambios en los números de células que tienen marcadores de la superficie celular característicos de células indiferenciadas, aunque también pueden ser utilizados cambios morfológicos como guía. Ejemplos de marcadores de la superficie celular incluyen el CD34⁺. Como alternativa, o además de, las reducciones en el número de células que tienen marcadores de la superficie celular típicos de células diferenciadas y de células indiferenciadas pueden ser vigiladas, por ejemplo, una reducción en el número de células que posea marcadores específicos de linaje, como por ejemplo el CD3, el CD4 y CD8.

De modo preferente, cualquier incremento en el número de células que presentan características típicas de células indiferenciadas se produce en 24 horas, de modo preferente en de 4 a 8 horas, de manera que cualquier cambio no pueda ser únicamente atribuido a proliferación celular.

Puede ser deseable realizar un precibado de agentes que ligan con, por ejemplo, receptores de la superficie celular, como por ejemplo los receptores de clase I o clase II del MHC. Cualquier agente identificado como ligante de receptores de superficie celular elegidos como objetivo puede, por consiguiente, ser utilizado en el ensayo referido para determinar su efecto sobre la retrodiferenciación. Como un ejemplo concreto, colecciones de representación de bacteriófagos que expresen dominios de enlace de anticuerpos pueden ser utilizados para identificar fragmentos de anticuerpos (típicamente scFvs) que enlacen con un marcador de la superficie celular elegido como objetivo, como por ejemplo la región homóloga de la cadena β de los receptores de clase II del MHC. Ensayos de enlace apropiados son conocidos en la técnica, como es la generación e identificación sistemática de colecciones de representación de bacteriófagos. También pueden utilizarse ensayos para identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos optimizados, por ejemplo para identificar sistemáticamente una colección mutagenizada de derivados de un anticuerpo ya mostrado para llevar a cabo la retrodiferenciación.

IX. Usos

En la presente memoria también se describen procedimientos de y un dispositivo para la retrodiferenciación de células comprometidas en células indiferenciadas. En particular, en la presente memoria se describe un procedimiento y dispositivo para la preparación de una célula madre a partir de una célula más diferenciada. Las implicaciones clínicas de ello son enormes dado que las células madre están siendo utilizadas en una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas pero hasta ahora resultó difícil, engorroso y algunas veces éticamente controvertido obtenerlas.

Las células madre producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas para repoblar poblaciones celulares específicas en un paciente, como por ejemplo una población celular hematopoyética o una subpoblación de ésta, como por ejemplo linfocitos T CD4. Las células más comprometidas utilizadas para producir las células madre pueden ser del mismo paciente o de un donante compatible. Así, las células madre producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas para curar y reconstituir tejido y órganos celulares especializados. Por ejemplo, las células indiferenciadas podrían ser utilizadas para producir células recommitadas, como por ejemplo las células que revisten los alvéolos de los pulmones, creando así un mecanismo mediante el cual el tejido pulmonar dañado o enfermo puede ser sustituido o reparado (véase Le Page, New Scientist 19 Diciembre 2000, p 20).

Así, las células madre producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser introducidas en el paciente para repoblar células del cuerpo. Convenientemente, las células madre primero se injertan y a continuación se repoblan.

Convenientemente, las células madre pueden ser introducidas *in vivo* utilizando la transferencia liposómica.

Así, en la presente memoria se describe también un medicamento que comprende una célula indiferenciada preparada mediante uno cualquiera de estos procesos o mediante el dispositivo adjunto con un diluyente, portador o excipiente apropiado.

5 En un ejemplo, el medicamento que comprende la célula indiferenciada puede ser utilizado para producir una célula comprometida más beneficiosa, como por ejemplo una que tenga una estructura genómica correcta, con el fin de aliviar cualquier síntoma o trastorno producido por o asociado con una célula más comprometida que tenga una estructura genómica correcta. Así, en la presente memoria se describe también un proceso de supresión de una mutación adquirida a partir de una célula más comprometida, en el que el procedimiento comprende la constitución
10 de una célula indiferenciada mediante el procedimiento descrito en la presente memoria, comprometiendo la célula indiferenciada en una célula recomprometida, por medio de lo cual la disposición o redistribución del genoma y/o del núcleo de la célula provoca que la mutación sea suprimida.

De modo preferente, el gen es insertado dentro de la región inmunoglobulínica o la región TCR del genoma.
15

En la presente memoria se describe también un procedimiento para tratar a un paciente aquejado de una enfermedad o de un desorden derivado de una célula defectuosa o de una célula no deseada, comprendiendo el procedimiento la preparación de una célula indiferenciada poniendo en contacto una célula más comprometida con un agente que provoque que la célula más comprometida se retrodiferencie en la célula indiferenciada, y a continuación el compromiso opcional de la célula indiferenciada en una célula recomprometida; en el que la célula indiferenciada, o la célula recomprometida, afecta a la célula defectuosa o a la célula no deseada para aliviar los síntomas de la enfermedad o del desorden o para curar al paciente de la enfermedad o trastorno.
20

Como alternativa, la célula indiferenciada podría ser utilizada para producir una célula más comprometida que produzca una entidad que cure cualquier síntoma o trastorno ocasionado por o asociado con una célula más comprometida que tenga una estructura genómica incorrecta.
25

Por ejemplo, la presente invención puede ser utilizada para preparar anticuerpos o receptores de células T frente a un antígeno que se exprese mediante la célula más comprometida la cual se ha retrodiferenciado en la célula indiferenciada. En este sentido, el antígeno puede ser un antígeno fetoespecífico o un antígeno fetoespecífico reactivo cruzado.
30

En la presente memoria se describe también un proceso y un dispositivo para el control de los niveles de las células indiferenciadas y de las células más comprometidas. Por ejemplo, en la presente memoria se describe un procedimiento que comprende la constitución de una célula indiferenciada mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención y, a continuación, la activación de un gen apoptótico para producir un efecto sobre la célula indiferenciada, como por ejemplo para producir la muerte de ésta.
35

En un ejemplo preferente, la presente invención se refiere a un proceso de introducción de un gen en el genoma de una célula indiferenciada en el que, el proceso comprende la introducción del gen en una célula más comprometida y, a continuación, la preparación de una célula indiferenciada mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención, por medio de lo cual el gen está presente en la célula indiferenciada.
40

En la presente memoria se describe también un proceso de introducción de un gen en el genoma de una célula indiferenciada, en el que el proceso comprende la inserción del gen en el genoma de una célula más comprometida y, a continuación, la preparación de una célula indiferenciada mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención, por medio de lo cual el gen está presente en la célula indiferenciada.
45

El gen puede ser un gen que haga más resistente la célula indiferenciada y las células más diferenciadas obtenidas de aquél a las infecciones patogénicas, como por ejemplo una infección viral. En particular, a modo de ejemplo, los linfocitos B procedentes de pacientes con SIDA pueden ser utilizados para producir células madre que a continuación sean genomanipuladas para que sean resistentes a la infección por VIH. Cuando se expande e introduce en los pacientes, los linfocitos T cooperadores resultantes pueden también ser resistentes a la infección por VIH.
50

Como alternativa, en la presente memoria se describe un proceso de introducción de un gen en una célula indiferenciada, en el que el proceso comprende la inserción del gen en el genoma de una célula más comprometida y, a continuación, la preparación de una célula por medio de lo cual el gen está presente en el genoma de la célula indiferenciada.
55

Así mismo, en la presente memoria se describe un procedimiento de preparación de la célula indiferenciada, en el que el procedimiento incluye el compromiso de la célula indiferenciada en una célula recomprometida y, a continuación, la fusión de la célula recomprometida en un mieloma. Ello posibilita la expresión *in vitro* de grandes cantidades del producto deseado, como por ejemplo un anticuerpo, o un antígeno o una hormona etc.
60

Una célula indiferenciada puede ser preparada mediante cualquiera de estos procedimientos descritos en la presente memoria.
65

ES 2 330 190 T3

En un ejemplo adicional, el dispositivo de acuerdo con la presente invención, o el procedimiento descrito en la presente memoria puede ser utilizado para cultivar de manera eficaz progenitores eritroides para la producción de eritrocitos, eritrocitos que pueden ser utilizados para reponer las carencias de los suministros de sangre, por ejemplo. Convenientemente, un procedimiento descrito en la presente memoria puede ser utilizado para producir megacariocitos para su uso en la producción de plaquetas.

En un ejemplo alternativo, el dispositivo y/o el procedimiento puede ser utilizado en la preparación de bancos de células indiferenciadas, esto es, bancos de células tratadas.

Otros aspectos descritos en la presente memoria incluyen:

El uso de cualquiera de los agentes descritos en la presente memoria para la creación de células indiferenciadas a partir de una célula más comprometida.

El uso de una célula indiferenciada producido de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria para producir cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal o un anticuerpo específico a partir de un linfocito B o un linfocito T; una célula a partir del linaje monocítico macrofágico; una célula nucleada capaz de expresar antígenos de la clase I o de la clase II; una célula capaz de ser inducida para expresar antígenos de clase I o de clase II; una célula desnucleada; una célula fragmentada; o una célula apoptótica.

El uso de una célula indiferenciada producido de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria para la producción de linfocitos T efectivos a partir de linfocitos B y/o *viceversa*.

El uso de una célula indiferenciada producido de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria para la producción de cualquiera de los siguientes productos u otros además de ellos: un medicamento, como por ejemplo un medicamento que comprenda o que esté fabricado a partir de un linfocito B, un linfocito T, una célula a partir del linaje monocítico macrofágico, una célula nucleada capaz de expresar un antígeno de clase I o de clase II, una célula capaz de ser inducida para expresar un antígeno de clase I o de clase II, o una célula desnucleada.

La presente invención describe también unos procesos que utilizan los empleos y productos y composiciones anteriormente mencionados preparados mediante dichos procesos.

La presente invención describe también un medicamento que comprende una célula indiferenciada de acuerdo con la presente invención o un producto obtenido de ella mezclado con un diluyente, portador o excipiente.

En un ejemplo preferente el medicamento comprende un anticuerpo o un antígeno obtenido a partir de una célula indiferenciada de acuerdo con la presente invención mezclado con un diluyente, portador o excipiente apropiado.

De modo preferente, el medicamento está destinado al tratamiento de cualquier trastorno entre los siguientes: cáncer, enfermedades autoinmunitarias, desórdenes sanguíneos, regeneración celular o tisular, generación de órganos, el tratamiento de trasplantes de órganos o tejidos, o desórdenes metabólicos congénitos.

Los procedimientos de la invención y los productos obtenidos mediante esos procedimientos, como por ejemplo las células indiferenciadas, pueden ser empleados en la investigación, por ejemplo para estudiar la retrodiferenciación, la diferenciación y para identificar y estudiar nuevos antígenos de desarrollo y antígenos de diferenciación de racimos.

X. Administración

Las células madre y las células recombinadas descritas en la presente memoria, así como los agentes mostrados para retrodiferenciar células, pueden ser utilizados en procedimientos terapéuticos. De modo preferente, las células o agentes de la invención son combinados con diversos componentes para producir composiciones de la invención. De modo más preferente, las composiciones son combinadas con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica (la cual puede estar destinada a un uso humano o animal). Vehículos y diluyentes apropiados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo una solución salina tamponada con fosfato. La composición de la invención puede ser administrada mediante inyección directa. La composición puede ser formulada para su administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

Las composiciones que comprenden células son típicamente administradas mediante inyección o implante. Las células pueden ser administradas en suspensión o integradas en una matriz de soporte, como por ejemplo matrices biodegradables naturales y/o sintéticas. Las matrices naturales incluyen matrices de colágeno. Las matrices biodegradables sintéticas incluyen polianhídridos y ácido poliláctico. Estas matrices proporcionan soporte para células frágiles *in vivo* y son preferentes para células no hematopoyéticas.

La administración puede así mismo consistir en una administración controlada, esto es, a lo largo de un periodo de tiempo que puede oscilar entre varios minutos y varias horas y días. La administración puede ser sistémica (por ejemplo mediante inyección intravenosa, o dirigida a un emplazamiento de interés concreto).

Las células son típicamente administradas en dosis desde 1×10^5 a 1×10^7 células por Kg. Por ejemplo, a un paciente de 70 kg se le pueden administrar un 14×10^6 CD34⁺ células para la reconstitución de tejidos hematopoyéticos.

Las pautas de administración y dosificación descritas están destinadas solo a servir como guías, dado que un facultativo experto será capaz de determinar con facilidad la pauta óptima de administración y dosificación para cualquier paciente y anomalía.

Todos los procedimientos detallados a continuación son apropiados para su uso con un dispositivo de acuerdo con la presente invención.

A. Materiales y procedimientos

Pacientes

Las muestras de sangre fueron obtenidas en tubos de color violeta con EDTA de pacientes con leucemias linfocíticas crónicas de células B, pacientes con deficiencia de anticuerpos (incluyendo deficiencia de IgA e hipogammaglobulinemias infantiles ligadas al cromosoma X), pacientes con infecciones de VIH y síndrome de SIDA, un paciente con citomegalovirus, un paciente con linfomas de Hodgkin, un paciente con leucemia aguda de células T, un bebé de 6 días con blastocitosis, diversos pacientes con diversas infecciones y afecciones clínicas, sangre del cordón umbilical, de la médula ósea, y preparaciones enriquecidas con linfocitos B de donantes de sangre sanos. Así mismo, se obtuvieron muestras de sangre de la capa leucocítica de donantes sanos.

Condiciones clínicas y experimentales

Las condiciones de tratamiento clínicas y experimentales de los pacientes, incluyendo los diversos tipos de tratamiento aplicadas a sus muestras de sangre, se describen en la Tabla 1. Los recuentos diferenciales de glóbulos blancos (WBC) se obtuvieron utilizando un Contador Coulter y se incluyen en la misma Tabla.

Tratamiento de la sangre

Las muestras de sangre, una vez obtenidas, fueron introducidas en una cámara junto con anticuerpos monoclonales puros hasta la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR (DAKO) dejando que se mezclarán a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas. Algunas muestras se mezclaron primeramente durante 15 minutos después de los cuales se dejaron incubar a 22°C. La concentración de anticuerpos monoclonales añadida a las muestras de sangre oscilaron entre 10 y 50 $\mu\text{l/ml}$ de sangre.

Así mismo, se aplicaron otros tratamientos a las mismas concentraciones, tratamientos que incluyeron la adición de un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno HLA-DR, un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de los antígenos de clase I, un anticuerpo monoclonal frente al CD4, un anticuerpo monoclonal frente al CD8, y un anticuerpo monoclonal conjugado PE frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR.

Otros tratamientos incluyeron la adición simultánea de anticuerpos monoclonales frente a las regiones homólogas de las cadenas α y β del antígeno HLA-DR a las muestras de sangre.

Así mismo, se añadieron a las muestras de sangre agentes alcalinizantes, como por ejemplo ciclofosfoamida en combinación con anticuerpos monoclonales puros frente la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR.

Después de estos tratamientos las muestras de sangre fueron teñidas con pruebas analíticas (pruebas) de anticuerpos monoclonales marcados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, a continuación, fueron analizadas utilizando citometría de flujo.

Los periodos de incubación con anticuerpos monoclonales oscilaron entre intervalos de 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas hasta 24 horas.

Anticuerpos marcados

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para detectar los siguientes marcadores sobre las células mediante citometría de flujo CD19 y CD3, CD4 y CD8, DR y CD3, CD56 & 16 y CD3, CD45 y CD14, CD8 y CD3, CD8 y CD28, un control de prueba múltiple (IgG1 FITC + IgG2a PE), CD34 y CD2, CD7 y CD13 & 33, CD10 y CD25, CD5 y CD10, CD5 y CD21, CD7 y CD5, CD13 y CD20, CD23 y CD57 y CD25 y CD45 RA (Becton & Dickenson y DAKO). Marcadores adicionales pueden incluir CD71 (marcador de glóbulos rojos), CD61 (marcador de megacariocitos), Glucoforina A (marcador de glóbulos rojos), AC133 (marcador de células madre), CD38 (marcador de células madre primitivas), CD90 (marcador de células madre) y CD117 (marcador de células madre pluripotentes).

Cada muestra de sangre del paciente, tanto la tratada como la no tratada, e incluyendo cada muestra de la capa leucocítica, fue analizada utilizando una pluralidad de los paneles expuestos dentro de un dispositivo de acuerdo con la presente invención con el fin de responder a los cambios inmunofenotípicos que acompañaron a los diferentes tipos

ES 2 330 190 T3

de tratamientos y éstos fueron llevados a cabo sobre diferentes porciones de la misma muestra de sangre. Las muestras no tratadas y otros tratamientos de control fueron teñidos y analizados de forma simultánea.

Citometría de flujo

La muestra de sangre fue teñida y analizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis por citometría de flujo fue llevado a cabo en un FACScan® ya sea con prueba simultánea o con software PAINT A GATE (BDIS) los cuales incluyeron la vuelta atrás de controles negativos. Se obtuvieron de 10.000 a 20.000 resultados que fueron almacenados en archivos tipo lista.

Morfología

La morfología fue analizada utilizando microscopia y la tinción de Wright.

Preparación de células madre a partir de linfocitos enriquecidos o purificados B-CLL (o normales) o a partir de muestras de sangre de la capa linfocítica

Técnicas asépticas deben utilizarse a lo largo de los siguientes procedimientos:

(A) Separación celular mononuclear

- (i) Obtener células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica/capa leucocítica mediante centrifugación en el Histopaque Lymphoprep, o cualquier medio de separación de linfocitos (grav. esp. 1.077) durante 30 minutos a 400 g.
- (ii) Recoger las células mononucleares en un tubo cónico de 50 ml y lavar con 30 mls de una solución salina equilibrada de Hank (Ca^{2+} y Mg^{+} libre, Sigma) con un 2% de suero de ternera fetal térmicamente activado (FCS) y 2 mM de EDTA o un 0,6% de citrato, y centrifugar a 400 g durante 10 min.
- (iii) Después del lavado contar las células y evaluar su viabilidad utilizando azul de tripano y un hemocitómetro.
- (iv) Si el recuento de células B es alto, por encima del 70% ($20 \times 10^9/\text{L}$, WBC), avanzar directamente hasta A (vi).
- (v) Si el recuento de células B es bajo, por debajo del 70% ($20 \times 10^9/\text{L}$, WBC), llevar a cabo una selección negativa utilizando microesferas Macs o una técnica de purificación FacsVantage, de acuerdo con lo descrito más abajo en la Sección C.
- (vi) Resuspender las plaquetas celulares a una concentración de $3 \times 10^6/\text{ml}$ en un medio IMDM ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin), con un 10% de FCS (térmicamente inactivado) y un 10% de HS (térmicamente inactivado), situar en bolsa de sangre. Nota: si no está disponible el FCS y el HS utilizar de 20% a un 50% de plasma autólogo.

Preparación de células madre (indiferenciadas) en fracciones mononucleares obtenidas a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con B-CLL

Seguir el protocolo de separación celular mononuclear (A) expuesto, excepto en cuanto la selección negativa no debe llevarse a cabo cuando el recuento de glóbulos blancos excede de un 20×10^6 por ml de los cuales el 50% de los glóbulos blancos son células B.

Los siguientes procedimientos pueden llevarse a cabo en un dispositivo de acuerdo con la presente invención.

(B) Tratamiento celular utilizando el anticuerpo monoclonal puro CR3/43 (Dako)

Después de que la separación celular mononuclear se ha conseguido en A (vi), proceder del modo siguiente:

- (i) Colocar la bolsa de sangre de entrada (a partir de A (vi) expuesta) en el gancho de soporte,
- (ii) utilizar una cámara con seis pocillos, programar el dispositivo para añadir 2 mls de suspensión celular de la bolsa de sangre de entrada La partir de A (vi) anterior] a cada pocillo de esta bandeja o cámara de cultivos multipocillo.
- (iii) Programar el dispositivo para tratar un número apropiado de pocillos cada uno con $99 \mu\text{l}/\text{ml}$ (o $49,5 \mu\text{l}/\text{ml}$ con respecto a las muestras de la capa leucocítica) del CR3/43 (anticuerpo monoclonal puro, Dako) de una jeringa con mab (anticuerpo monoclonal) CR3/43, dejando las otras células sin tratar (control negativo).
- (iv) incubar la cámara en un 5% de CO_2 a 37°C (o 33°C) en una atmósfera húmeda.

ES 2 330 190 T3

(C) Purificación de Células

Se conocen diversos procedimientos para la separación y purificación de células (véase Vettesse-Dadey Scientist 13 (18): 21 13 Sep. 1999).

Un procedimiento apropiado es la selección negativa de células B utilizando microesferas MACS (Miltenyi Biotec, aquí lo mejor es seguir las instrucciones del fabricante):

- (i) Obtener células mononucleares como en la Sección A *supra*.
- (ii) Células plaquetarias y resuspendidas en un volumen final de células totales de 300 μ l por 10^8 en HBSS (consistente en un 2% de FCS y 2 mM de EDTA o un 0,6% de citrato).
- (iii) Añadir 100 μ l por 10^8 de células totales de anticuerpos monoclonales puros al CD2 (IgG1, DAKO).
- (iv) A la misma suspensión de células añadir 50 μ l por 10^8 por las células totales del anticuerpo monoclonal puro al CD33 (IgG1, DAKO).
- (v) Dejar incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- (vi) Lavar las células con HBSS (con un 2% de FCS y 2 mM de EDTA) y resuspender en una concentración final de 400 μ l por 10^8 células totales, con el mismo tamponador. Centrifugar a 400 g durante 10 min. Resuspender las plaquetas en HBSS (como *supra*).
- (vii) Añadir 100 μ l de microesferas marcadas con IgG1 de antirratón de conejo por un 10^8 de células totales (o seguir las instrucciones del fabricante).
- (viii) Mezclar a fondo las células e incubar de 6°C a 12°C (refrigerador) durante 15 minutos.
- (ix) Lavar de nuevo las células con HBSS (con un 2% de FCS y un 2 mM de EDTA), centrifugar a 400 g x 10 mins y resuspender en una concentración final de 500 μ l por un 10^8 de células totales, con el mismo tampón.
- (x) Agrupar la columna MS⁺/RS⁺ en el campo magnético del separador MACS. Si el recuento de células mononucleares es alto utilizar dos columnas MS⁺/RS⁺.
- (xi) Lavar la columna con 3 mls de HBSS (con un 2% de FCS y un 2 mM de EDTA).
- (xii) Hacer pasar las células a través de la columna y a continuación lavar con 4 x 500 μ l con HBSS (con un 2% de FCS y un 2 mM de EDTA).
- (xiii) Eluir y recoger las células en un tubo cónico. A continuación sedimentar y resuspender en IMDM y colocar en una bolsa de sangre como en la Sección A (vi).

D) Células B purificadas con FACSVantage

- (i) Obtener células mononucleares a partir de muestras de sangre periféricas de pacientes con B-CLL, según lo descrito en la Sección A, *supra*.
- (ii) Teñir estas células con una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados CD 19-PE y CD20-FITC para identificar las células B.
- (iii) Sobre la base de la fluorescencia de CD19/CD20 clasificar aproximadamente 10^7 células utilizando un Vantage FACS Beckton Dickenson y láser de argón que emita a 488 nm.
- (iv) Lavar las células purificadas con una solución salina equilibrada Hanks con un 50% de FCS y a continuación dejar que se recupere hasta el día siguiente a 37°C en un incubador humidificado a un 5% de CO₂.
- (v) Sedimentar y resuspender las células y colocar en una bolsa de sangre, según lo descrito en la Sección A (vi) *supra* y a continuación tratar con CD3/43 de acuerdo con lo descrito en la Sección B *supra*.

Preparación de células madre en células sanguíneas

El tratamiento de células con anticuerpos monoclonales puros CD3/43 (Dako) en sangre puede llevarse a cabo en un dispositivo de acuerdo con la presente invención:

- (i) Seleccionar los pacientes con recuentos de WBC de 30-200 x 10^9 /L (oscilando de un 73 a un 95% de linfocitos B).

ES 2 330 190 T3

- (ii) Recoger la sangre mediante venopunción en tubos con citrato, EDTA-o heparina exenta de preservativo, colocar la sangre en una bolsa de sangre. De modo preferente, la sangre recogida es utilizada inmediatamente y, de modo pertinente, dentro de, de modo aproximado, las 6 horas a partir de la recogida. Sin embargo, también puede ser utilizada la sangre almacenada/congelada con nitrógeno después de la descongelación.
- (iii) Colocar la bolsa de sangre procedente de (ii) comprendiendo la sangre del dispositivo de acuerdo con la presente invención.
- (iv) Se lleva a cabo el recuento diferenciado automático de glóbulos blancos utilizando un contador Coulter. Los pacientes con recuentos de glóbulos blancos de $30-200 \times 10^6$ por ml (de los cuales de un 60 a un 95% sean células B) son seleccionados de modo preferente.
- (v) La viabilidad de la sangre puede también ser evaluada de forma automática, incluyendo como procedimientos apropiados ya sea yoduro de propidio y citometría de flujo o azul de tripano y un hematocitómetro después de la lisis de los glóbulos rojos utilizando una solución de cloruro de amonio.
- (vi) Se añaden anticuerpos CR3/43 a una muestra de la sangre de la cámara del dispositivo, en una concentración final de células de $1-3 \mu\text{l}/10^6$ (por ejemplo si el recuento de WBC fue de $50 \times 10^9/\text{L}$, entonces deben ser añadidos $50 \mu\text{l}$ del anticuerpo monoclonal CR3/43, con una concentración de IgG de ratón de $159 \mu\text{g}/\text{ml}$).
- (vii) Mezclar la sangre y los anticuerpos a fondo utilizando una paleta dentro de la cámara del dispositivo y dejar durante un periodo de tiempo determinado no inferior a 2 horas, a temperatura ambiente, de modo preferente entre 18°C y 37°C , en la cámara incubada.
- (viii) Analizar las células sanguíneas utilizando citometría de flujo, ensayos clónicos, cultivos a largo plazo y/o análisis PCT durante 0 hr., 2 hr., 6 hr. Y 24 hr. después de la adición de mAbs utilizando medios de rastreo del dispositivo.

Nota: Debido a la agregación homotípica de células B y a la formación de células adherentes en el fondo del tubo de ensayo inducida por el mAb CR3/43, mezclar a fondo y obtener una muestra de células utilizando unas puntas de pipeta de diámetro interior grande antes del análisis.

Con el fin de obtener una población de células uniforme a lo largo del análisis, dividir la muestra de sangre en porciones separadas dentro de una pluralidad de cámaras antes del tratamiento con CR3/43.

Preparación para el análisis de células madre producidas mediante el tratamiento de células B cultivadas con el anticuerpo monoclonal CR3/43

Las células madre producidas utilizando los procedimientos de la invención pueden ser evaluadas en una pluralidad de puntos temporales, por ejemplo cada 2 hr, 7 hr, 24 hr, diariamente, cada 7 días, o periodos más largos (meses, después de la alimentación semanal de células con un medio de cultivo a largo plazo). Uno o más pocillos de tratamiento y control pueden ser analizados en cada punto temporal, siendo analizados posteriormente en periodos de tiempo sucesivos los pocillos de tratamiento y control restantes.

Esta valoración puede, así mismo, llevarse a cabo de forma automática mediante medios de rastreo incorporados en el dispositivo de la presente invención.

- (i) Retirar suavemente la capa no adherente utilizando una pipeta de diámetro interior grande y romper los racimos de células mediante aspiración repetida empleando una pipeta de diámetro interior grande para obtener una suspensión de células aisladas.
- (ii) Utilizando un raspador de células, raspar la capa adherente y romper suavemente los racimos de células para obtener una suspensión de células simples mediante aspiración repetida empleando una pipeta de diámetro interior grande.
- (iii) Como alternativa tripsinizar la capa adherente aclarando primeramente con HBSS y añadiendo a continuación 2 ml de 0,25% de tripsina por pocillo e incubar a 37°C durante 10 minutos.
- (iv) Alterar suavemente los racimos de células mediante el pipeteo repetido dentro de una pipeta de diámetro interior grande.
- (v) Después de 10 mins., incubar con un 20% de FCS hasta obtener una concentración final para desactivar la tripsina.

ES 2 330 190 T3

- (vi) Las células de cultivo obtenidas en (ii) o (v) *supra* pueden ser agrupadas para cada tipo (esto es, células tratadas y no tratadas) en cada punto temporal y centrifugadas a 400 g durante 10 mins.
- (vii) Para el análisis del PCR (véase C), el gránulo de células (células tratadas y no tratadas) obtenidas en (vi) debe ser usado directamente.
- (viii) Para el análisis de ensayo clónico, el gránulo de células (tratadas y no tratadas) obtenido en la etapa (ii) o en la etapa (v) *supra* es resuspendido en IMDM con un 2% de FCS termoactivado. Una pequeña porción de células puede ser retirada para el recuento de las células y para valorar su viabilidad utilizando azul de tripano y un hemocitómetro.
- (ix) Para el análisis FACs, resuspender el gránulo de células (células tratadas y no tratados) obtenido en la etapa (ii) o en la etapa (v) *supra* en la Solución Salina Equilibrada de Hanks (exenta de calcio y magnesio) con un 2% de FCS termoactivado y 5 mM de EDTA.

Análisis de células madre

Los siguientes procedimientos puede ser utilizados para la evaluación de células madre. El dispositivo de acuerdo con la presente invención puede incluir unos medios de rastreo para llevar a cabo los o parte de los procedimientos detallados a continuación en la presente memoria.

(A) Inmunofenotipo

Para el análisis inmunofenotípico (utilizando Citometría de Flujo) para muestras de sangre:

- (i) Inmunotestear (de acuerdo con las instrucciones del fabricante, lisar los eritrocitos y lavar las células después del periodo de incubación y tratar con el mAb. Típicamente pueden ser utilizados las soluciones de lisado y lavado de Becton Dickinson.
- (ii) Los leucocitos (de la sangre, de la fracción mononuclear, de las células B negativamente seleccionadas con microesferas MACS o clasificadas con B-CLL) deben ser marcadas con los mAbs combinados directamente con isotiocianato fluorescente (FITC) o ficoeritrina (PE).
- (iii) Los marcadores de las pruebas utilizados en el análisis inmunofenotípico pueden ser como sigue:
- CD38 PE + CD45 FITC + CD34 PE-Cy5
 - CD 19 PE + CD 10 FITC + CD34 PE-Cy5
 - CD 117 PE + CD3 FITC + CD34 PE-Cy5
 - CD33 PE + CD61 FITC + CD34 PE-Cy5
 - Glucoforina A PE + CD71 FITC + CD34 PE-Cy5
 - AC133 PE + CD90 FITC + CD34 PE-Cy5
 - CD 19PE + CD5 FITC
 - IgG1 PE + IgG1 FITC + IgG1 PE-Cy5 (control negativo isotópico)
- (iv) Puede llevarse a cabo un marcador doble utilizando IMK + kit (Becto Dickinson) compuesto de los siguientes pares anticuerpo monoclonales:
- CD45-FITC y CD 14-PE;
 - CD19-PE y CD3-FITC;
 - CD8-PE y CD4-FITC;
 - HLA-DR-PE y CD3-FITC; y
 - CD56, CD16-PE y CD3-FITC.

ES 2 330 190 T3

Se incluyen también controles negativos de incompatibilidad de isótopos para IgG₁-FITC y IgG_{2a} -PE.

- (v) También pueden ser utilizados los siguientes anticuerpos adicionales los cuales son fabricados por Dako y Becton Dickinson:

PE-conjugada: anti-CD8, anti-CD33, anti-13, anti-CD34, anti-CD19, anti-CD2, anti-CD14, anti -CD33 y anti-CD5;

FITC-conjugado: anti-CD3, anti-CD7, anti-IgM, anti-CD22, anti-CD20, anti-CD10, anti-CD7, anti-CD16, anti-TCR $\alpha\beta$.

- (vi) Los siguientes también pueden ser utilizados.

- Las IgG₃ del mAb purificado por afinidad específico para el CD34 (Dako) puede ser utilizado y se detecta con FITC-o un fragmento F(ab)[']₂ inmunoglobulínico antimurino caprino marcado con PE, como anticuerpo secundario (DAKO).

- Quantum Red (PE-Cy5)-conjugado anti-CD34 (Dako) también fue utilizado.

- (vii) Analizar las células utilizando el FACSscan o FACS Vantage (Becton Dickinson) o cualquier otro citómetro de flujo. Debe analizarse un número de resultados de 100.000 células y anotarse el tiempo.

- (viii) Analizar los datos utilizando el software Proprietary Paint-a-Gate, Lysis II, Consort 30 y CellQuest.

Para el análisis inmunofenotípico (utilizando Citometría de Flujo) o muestras de capas leucocíticas por ejemplo:

- (i) Inmunotear (de acuerdo con las instrucciones del fabricante), lisar los eritrocitos y lavar las células después del periodo de incubación y tratar con el mAb. Típicamente pueden ser utilizadas las soluciones de lisado y lavado ofrecidas por Becton Dickinson.

- (ii) los leucocitos deben ser, o bien marcados de forma doble o simple con mAbs conjugados directamente con isotiocianato de fluorescerina (FITC), fiocoretrina (PE) o RPE-Cy5.

Oportunamente pueden ser utilizados los siguientes marcadores rotulados:

CD34 (marcador de célula madre); CD19 (marcador de linfocitos B); CD45 (marcador de leucocitos);

CD3 (marcador de linfocitos T); CD33 (marcador de milocitos); CD71 (marcador de glóbulos rojos); CD61 (marcador de megacariocitos); Glucoforina A (marcador de glóbulos rojos),

AC133 (marcador de células madre); CD38 (marcador de células madre primitivas); CD90 (marcador de células madre); CD10 (marcador de células madre linfoides); CD117 (marcador de células madre pluripotentes);

IgG1 (control negativo).

(B) Morfología

Para análisis morfológico:

Microscopia Luminosa

- (i) Resuspender las células en IMD con un 2% de FCS termoactivada utilizando puntas de pipetas de diámetro interior grande.

- (ii) Examinar bajo un microscopio Leitz utilizando una solución de tinción apropiada, por ejemplo una May y Greenwald Staining Solution (BDH Chemical Ltd) puede ser utilizada para el análisis de las células mieloides y linfoides. La persona experta será sin dificultad consciente de la existencia de otras tinciones apropiadas para la identificación de otras colonias, por ejemplo tinciones de Wright o Giemsa.

- (iii) El análisis morfológico de los linfocitos B-CLL puede llevarse a cabo en frotis de sangre o preparaciones citocentrífugas, respectivamente.

ES 2 330 190 T3

Microscopia Confocal

- (i) Obtener células B de acuerdo con lo descrito con anterioridad (células B-CLL o células B sanas obtenidas de una capa leucocítica de donantes de sangre sanos).
- (ii) Tratar las células B con el anticuerpo monoclonal CR3/43 de acuerdo con lo descrito con anterioridad.
- (iii) Añadir 2 ml de suspensión de células a un plato de cultivo de órganos (el fondo de este plato está equipado para que tenga una sobrecubierta).
- (iv) Añadir 15 μ l de anticuerpo monoclonal al conjugado FITC del CD19 y 15 μ l de anticuerpo monoclonal a la PE del CD34/conjugado de Cy5 (Quantum Red).
- (v) Utilizar yoduro de propidio para evaluar la viabilidad y Hoechst para teñir los núcleos.

(C) Análisis con el PCR de la disposición génica de los segmentos VDJ/JHF

La región VDJ y/o JHF del gen de la IgH fue analizado mediante un PCR (ciclador térmico Perkin Elmer) utilizando ADN de plantilla a partir de muestras de sangre periférica con B-CLL y de capa leucocítica antes y después (2 hr, 6 hr y 24 hr) del tratamiento con anticuerpos. Este protocolo está adaptado a partir de Stolc *et al* (American Journal of Hematology 38: 1-8; 1991). Los cebadores de JHF son utilizados para la detección positiva del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina en una configuración de línea germinativa. Los cebadores del JH6 son utilizados como un control interno positivo del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina. En células B leucémicas así como en linfocitos normales, la región JHF es siempre suprimida y, por consiguiente, no puede ser amplificada, mientras que el control interno del gen JH6, permanece intacto. Como control fue utilizado el gen β -actina.

- (i) Aislar el ADN genómico respecto de la sangre utilizando el kit de sangre Qiagen QiAmp Maxi. Utilizar el protocolo de máximo rendimiento. Extraer todo el ADN de cada muestra (tratada y no tratada).
- (ii) Ejecutar diluciones limpias y de 1:5 de ADN en un gel de agarosa al 1,5% para evaluar la concentración y la calidad.
- (iii) PCR-calentar 2-3 μ l de plantilla de ADN genómica limpia a 96°C durante 5 minutos.

I) JH6a/JH6g JHFa/JHFg

Preparar una “mezcla maestra” suficiente para 4 pacientes (8 reacciones tratadas y no tratadas) de acuerdo con la tabla detallada abajo. Esto puede aumentar o disminuir a escalan según proceda.

	Volumen / μ L	[Final]
Agua libre de nucleasa	370	--
PCR 10 x Tampón	80	1x
*25 mM $MgCl_2$	64	2 mM
* 5 mM dNTPs	128	0,8 mM
10 μ M P1	80	1 μ M
10 μ M P2	80	1 μ M
5U / μ L Taq pol.	2	10 unidades

* Mezclar con una agitadora vorticial los tubos de 2 a 3 veces cada uno durante 5 segundos antes de usar para equilibrar la mezcla.

Separar 95 μ L de la “mezcla maestra” dentro de cada tubo con el ADN genómico desnaturalizado. Ajustar el termociclador a 95°C durante 1 min y 30 segs; a 55°C durante 2 mins.; a 72°C durante 1 mins y 30 segs. (35 ciclos) y a 72°C durante 5 mins (1 ciclo.)

ES 2 330 190 T3

II) β -actina

Preparar una “mezcla maestra” suficiente para 8 reacciones de acuerdo con lo descrito en I) arriba. Aumentar o disminuir a escala según corresponda.

	Volumen / μ L	[Final]
Agua libre de nucleasa	380	--
PCR 10 x Tampón	80	1x
*25 mM $MgCl_2$	48	1,5 mM
* 5 mM dNTPs	128	0,8 mM
10 μ M P1	80	1 μ M
10 μ M P2	80	1 μ M
5U / μ L Taq pol.	2	10 unidades
* Mezclar en vórtex 2 - 3 veces cada una 5 segundos antes de usar para equilibrar muestra		

Prorratear 95 μ L de la “mezcla maestra” en cada tubo con el ADN genómico desnaturalizado. Ajustar el termociclador a 95°C durante 1 min 30 segs; a 55°C durante 2 mins; a 72°C durante 1 min 30 segs (25 ciclos); y a 72°C durante 5 mins (1 ciclo).

Cebadores para el PCR

El primer conjunto de cebadores, diseñado para amplificar un fragmento de 240 bp del gen JHF IgH, se estableció como sigue:

JHFa AAA GGT GCT GGG GGT CCC CTG

JHFb CCC AGT GCT GGA AGT ATT CAG C

El segundo conjunto de cebadores, diseñado para amplificar un fragmento de 242 bp del gen JHF IgH que se une a la región 6 se estableció como sigue:

JH6a CAT TGT GAT TAC TAC TAC TAC TAC

JH6b GAT CCT CAA GGC ACC CCA GTG C

El tercer conjunto de cebadores, diseñado para amplificar un fragmento de 249 bp del gen β -acción se estableció como sigue:

Beta ACT-1 AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT

Beta ACT-2 TCG GTG AGG ATC TTC ATG AG

(D) Análisis Southern de la redistribución génica de la VDJ

(i) Reunir el ADN Genómico a partir de las muestras de sangre periféricas tratadas y no tratadas o de las células B purificadas (de pacientes con B-CLL), utilizando *BamHI/HindII*-se requiere típicamente una pluralidad de pocillos para ofrecer una cantidad suficiente de ADN para llevar a cabo el análisis.

(ii) Los conjuntos fueron reducidos en geles de agarosa al 0,8% y transferidos a unas membranas de nailon GeneScreen® (Dupont) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Southern, 1975).

ES 2 330 190 T3

(iii) La redistribución del gen IgH puede ser caracterizada mediante el análisis de la región J del locus IgH, utilizando una sonda para el ADN J_H humano marcado con ³²P-aislada del ADN genómico placentar (Calbiochem, Oncogene Science).

5 (iv) Las autorradiografías deben mantenerse a -70°C durante varios días antes del revelado.

(E) Cultivo a Largo Plazo

10 Los cultivos de células preparados de acuerdo con lo descrito con anterioridad pueden ser mantenidos durante periodos más largos (cultivo a largo plazo) mediante alimentación semanal utilizando un medio de cultivo a largo plazo (Medio Dulbeccos Modificado de Iscove (IMDM-Gibco BRL Life Technologies Ltd.), FCS termoactivado a un 10%, suero de caballo (HS) termoactivado al 10%, hidrocortisona al 1%, una disolución de partida de penicilina/estropimicina al 5×10^{-7} M al 1%).

15 (i) En primer lugar, después de un punto temporal determinado, por ejemplo 24 hr, desde el inicio del tratamiento con CR3/43, diluir las células en cada pocillo añadiendo 2 mls de medio de cultivo a largo plazo.

20 (ii) Alimentar los pocillos semanalmente después de la retirada de la mitad del medio de crecimiento.

(iii) Inspeccionar los pocillos utilizando un microscopio de contraste de fase.

(F) Ensayos Clónicos

25 (i) Después de cada periodo de tiempo después del inicio del tratamiento, puede obtenerse un medio de cultivo de 300 μ l de las células no adherentes, de acuerdo con lo descrito con anterioridad.

30 (ii) Añadir a la suspensión celular del medio de cultivo anterior 3 mls de methocult GFH4434 (StemCell Technologies, compuesto por metilcelulosa en IMDM, FCS, BSA, L-glutamina, factor de célula madre de rh, GM-CSF de rh, IL-3 de rh y eritropoyetina de rh).

(iii) Tomar 1,1 ml de mezcla celular y emplatarse por triplicado.

35 (iv) Incubar los platos a 37°C en un plato petri humidificado con un 5% de CO₂ y un 5% de O₂ durante 14 días.

(v) Inspeccionar los pocillos antes y después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal CR3/43 utilizando un microscopio de contraste de fase.

40 (vi) Después de 14 días las células (colonias) pueden ser analizadas mediante citometría de flujo, microscopia confocal y/o PCR.

(vii) Al llevar a cabo el ensayo clónico debe evitarse el aerosol alcohólico dado que ello produce la aglomeración o destrucción de células, impidiendo la supervivencia de ambos tipos de células (tratadas y no tratadas).

45

B. Resultados

Panel CD19 y CD3

50

El tratamiento de muestras de sangre en el dispositivo de acuerdo con la presente invención con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR siempre redujo el número relativo de células CD19⁺. Este marcador es un antígeno de todas las células B (véanse las Tablas). Este antígeno está presente en todos los linfocitos humanos B en todas las etapas de maduración pero se pierde en células de plasma diferenciadas de forma terminal. Por tanto, esto es una indicación de que las células B fueron retrodiferenciadas en células indiferenciadas.

55

El mismo tratamiento provocó que el número relativo de células CD3⁺ se incrementara drásticamente especialmente en la sangre de pacientes con B-CLL, lo que fue siempre acompañado por un incremento del número relativo de células CD3⁺ CD19⁻. El CD3 está presente en todos los linfocitos T maduros y en de un 65% a un 85% de timocitos. Este marcador se encontró siempre en asociación con los receptores de células T (TCR) α/β o γ/δ y, conjuntamente, estos complejos son importantes en la transferencia de señales hasta el interior de las células. Por tanto, ello es una indicación de que las células B se estaban retrodiferenciando en células indiferenciadas y a continuación comprometiéndose en nuevas células diferenciadas, a saber, células T.

60

Un clon novedoso de células apareció en la sangre tratada de pacientes con B-CLL que coexpresaban los marcadores CD19 y CD3-esto es, células CD19⁺ y CD3⁺ (véase Gráfica 1, números de paciente 2, 3 & 4 a las 2hr, 6 hr & 24 hr de iniciar el tratamiento), tratamiento que puede llevarse a cabo en el dispositivo de acuerdo con la presente

65

invención. Otros pacientes con diferentes trastornos mostraron un incremento en el número relativo de estos clones de células. Estas células fueron excepcionalmente grandes y muy granuladas y se expresaron niveles extremadamente altos de CD19 en su membrana celular. El marcador CD3 parece expresarse en estas células a niveles similares a los expresados en los linfocitos maduros normales.

En la Tabla 2 los números de paciente 2, 3 y 4 son de hecho números que representan al mismo paciente y su delimitación fue simplemente para demostrar el efecto del tratamiento en la sangre con el paso del tiempo (véase la Tabla 1 respecto de la condición experimental y clínica de este paciente).

Los clones CD19⁺ CD3⁺ en las muestras tratadas parecen reducirse con el paso del tiempo, alcanzado sus niveles originales a los determinados en la muestra no tratada a las 2 hrs, 6 hrs y 24 hrs.

Otro tipo de célula del mismo tamaño y granuladidad fue detectada en muestras tratadas y estas células tenían elevados niveles de CD19 expresados sobre su superficie pero fueron negativas con respecto al marcador CD3 y ricas en receptores FC. Sin embargo, el número relativo de estas células pareció reducirse con el tiempo. Como dato interesante, a las 24 horas del tratamiento de la muestra de sangre (2, 3 y 4) se produjo una reducción en el número relativo de células CD19⁺ CD3⁺ en un grupo de células en las que inicialmente se observó un incremento después del tratamiento de las muestras de sangre de 2 y 6 hrs. Sin embargo, los recuentos Coulter de poblaciones de WBC fueron reducidos tras el tratamiento de sangre con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del HLA-DR. Este hallazgo supuso que el tipo de tratamiento origina células atípicas que no pueden ser detectadas por el Coulter (Tabla 1) pero que pueden ser tenidas en cuenta cuando son medidas por citometría de flujo la cual cuenta las células sobre la base de los marcadores de superficie, el tamaño y la granuladidad. Así mismo, estas células atípicas fueron tenidas en cuenta mediante el análisis de la morfología utilizando la tinción de Wrigth bajo un microscopio. Las gráficas de citometría de flujo de estos fenómenos se representan en las Gráficas (1, 2, 3 & 4) y los cambios inmunofenotípicos obtenidos con el tratamiento de las muestras de sangre parece sugerir que los linfocitos CD19⁺ y CD3⁺ son un grupo interconectado de células pero que permanecen independientes sobre la base de la expresión relativa del CD19 y del CD3 en comparación con las células madre.

En la Tabla 2 los números de paciente 5 y 6 representan el mismo paciente pero los análisis de las muestras de sangre tratadas y no tratadas fueron controlados con el paso del tiempo y al mismo tiempo (véase Tabla 1).

La sangre de los pacientes sin malignidad de células B mostró similares tendencias de modificaciones inmunofenotípicas en comparación con la sangre de pacientes con B-CLL, pero las modificaciones no fue de la misma entidad. Sin embargo, el número relativo y absoluto de linfocitos B y de células positivas de clase II del MHC de la sangre de estos pacientes fueron extremadamente bajo en comparación con el encontrado en la sangre de los pacientes con B-CLL.

Dos hermanos, ambos con Hipogammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X, que tenían deficiencia de células B mostraron diferentes modificaciones inmunofenotípicas en el número relativo de células CD3⁺ con el tratamiento de la sangre. El hermano más joven que tenía dos meses de edad y no estaba enfermo, con el tratamiento de la sangre, mostró un ligero incremento en el número relativo de células de CD3⁺ lo cual fue acompañado por un número relativo del número relativo de células CD3⁺ CD19⁺. Por otro lado, el otro hermano, que tenía dos años de edad, y estaba muy enfermo y con un número relativamente alto de células T activadas con expresión de los antígenos DR mostró una reducción del número de células CD3⁺ con el tratamiento de la sangre. No se utilizaron otros marcadores para medir otras modificaciones inmunofenotípicas que pudieran haberse producido, porque las muestras de sangre obtenidas de estos dos pacientes fueron muy pequeñas (Tabla 2, ID 43/BD y 04/BD).

El paciente 91 de la Tabla 2 muestra una reducción del número relativo de células CD3⁺ después del tratamiento de la sangre que fue acompañado mediante un incremento del número relativo de células CD3⁺ CD19⁺. Sin embargo, tras el análisis de otros marcadores de superficie, como por ejemplo el CD4 y el CD8 (véase la Tabla 3) se observó que el paciente tenía un número relativo alto de células CD4⁺ CD3⁺ en la sangre y esto fue advertido antes del tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR y estas células positivas dobles se redujeron de forma apreciable después del tratamiento de la sangre. Así mismo, cuando se analizaron marcadores adicionales el número relativo de células CD3⁺ se apreció que se había elevado (véase la Tabla 4).

Una preparación relativa de linfocitos β obtenida de donantes de sangre sanos cuando fue tratada con un anticuerpo monoclonal frente a la cadena β de antígenos DR de un dispositivo de acuerdo con la presente invención, mostró un drástico incremento del número relativo de células CD3⁺, lo que siempre fue acompañado por una reducción del número de células CD19⁺ y por un incremento del número relativo de células CD19⁺ CD3⁺. Análisis ulteriores que utilizaban marcadores, como por ejemplo el CD4 y el CD8 muestran un incremento concomitante del número relativo de estos marcadores. Sin embargo, una preparación enriquecida de linfocitos T de los mismos donantes de sangre cuando fueron tratados con el mismo anticuerpo monoclonal no mostró los mismos cambios.

Panel Cod4 y CD8

El antígeno CD4 es el receptor del virus humano de la inmunodeficiencia. La molécula de CD4 se une al antígeno de clase II del MHC en el dominio B2, una región que es similar a los emplazamientos de unión del CD8 sobre los antígenos de clase I. La unión del CD4 a los antígenos de clase II potencia la reactividad de las células T a los

antígenos y lo mismo sucede con la unión del CD8 a los antígenos de clase I. Los antígenos CD8 están presentes en el subconjunto de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos así como en un subconjunto de linfocitos citolíticos naturales y en una mayoría de timocitos normales. Los antígenos CD4 y CD8 están coexpresados en los timocitos y estas células pierden sus marcadores cuando maduran en linfocitos T.

Tras el análisis de los marcadores CD4 y CD8-véase abajo-y a partir de una mayoría de muestras de sangre presentadas en la Tabla 2, se desprende una pauta de tinción que soporta la presencia de un proceso de retrodiferenciación de linfocitos B en células indiferencias y la subsecuente diferenciación en linfocitos T.

Las células CD4⁺ CD8⁺ las cuales son células positivas dobles, siempre aparecieron después del tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga a la cadena β y este tipo de células se incrementó intensamente en la sangre de las muestras tratadas de pacientes con B-CLL y que estaban ausentes de forma total en las muestras no tratadas (véase la Tabla 3 y las Gráficas 1, 2, 3 & 4). En las mismas muestras el número relativo de células positivas simples, como por ejemplo las células CD8⁺ y CD4⁺ también se advirtió que aumentaban de manera simultánea. Así mismo, una reducción del número relativo de células CD4⁺ CD8⁻ las cuales, al menos en el caso de la B-CLL se corresponden con células B, se advirtió que caían de forma drástica en las muestras tratadas en comparación con las muestras no tratadas las cuales permanecieron en el mismo nivel al medirlas en el tiempo. Sin embargo, la medición del número relativo de células CD4⁺ CD8⁺ con el paso del tiempo en muestras tratadas demostró que había un incremento concomitante en el número relativo de células simples con una reducción en el número relativo de células positivas dobles. Este tipo de cambio inmunofenotípico es característico del desarrollo tímico de las células progenitoras del linaje de los linfocitos T en el timo (número de paciente 2, 3 y 4). El antígeno CD4 está presente en los subconjuntos de linfocitos T cooperante/inductor (CD4⁺ CD3⁺ y una mayoría de timocitos normales). Sin embargo, este antígeno es de baja intensidad en la superficie celular de los monocitos y en el citoplasma de los monocitos y los macrófagos (CD3⁻ CD4⁺).

El número relativo de células bajas en CD4⁺ resultó afectado de manera diferente en muestras de sangre diferentes después del tratamiento del dispositivo de acuerdo con la presente invención. El número relativo de este tipo de células parece resultar no afectado en muestras de pacientes con B-CLL después del tratamiento, en comparación con las muestras no tratadas. Dichos bajos niveles de la expresión del CD4 se encontró en monocitos y en timocitos muy tempranos.

El paciente HIV⁺25 con el tratamiento mostró un incremento sustancial del número de células positivas dobles con expresión del CD4 y CD8 de manera simultánea. Por otro lado, el paciente 91 tras el tratamiento mostró una reducción de este subtipo de células y la reducción de dicho fenómeno depende del tiempo. El número relativo de células CD8⁺ se observó que aumentaba en muestras de sangre no tratadas de pacientes con B-CLL al ser medidas en el tiempo mientras que el número relativo de células con bajo CD4⁺ y CD4⁺ se observó que decrecía en los mismos tiempos (Tabla 3, paciente 2, 3 y 4).

Panel DR y CD3

Los marcadores DR están presentes en monocitos, células dendríticas, células B y linfocitos T activados.

Las muestras tratadas y no tratadas analizadas con estas pruebas el mostraron cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos cuando las muestras de sangre fueron analizadas con los marcadores CD19 y CD3 (véase la Tabla 2) y estos antígenos, según se indicó anteriormente, son marcadores totales de células B y T.

El tratamiento de sangre en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con anticuerpos monoclonales parece afectar al número relativo de linfocitos B del DR⁺, de manera que el nivel de las células DR⁺ se reduce. Por el contrario, el número relativo de células con CD3⁺ (células T) aumenta de modo considerable (véase la Tabla 4 y la Gráfica). Así mismo, el número relativo de células T se incrementó en la mayoría de muestras de sangre tratadas en pacientes con B-CLL y estos tipos de células resultaron afectados de manera variable en las muestras tratadas de pacientes con otras alteraciones.

Así mismo, el número relativo de células positivas con alto DR apareció en números significativos de muestras tratadas de pacientes con B-GLL y de un bebé de 6 días con blastos de DR⁺ CD34⁺ incrementados en la sangre. Sin embargo, debe destacarse que los blastos que estaban presentes en la sangre de este paciente fueron negativos para los marcadores de células T y B antes y después del tratamiento, pero resultaron más positivos para los antígenos de linaje mieloide después del tratamiento. El número relativo de células CD3⁻ DR⁻ se incrementó en la mayoría de muestras de sangre tratadas y fue proporcional a los incrementos del número relativo de células CD3⁺ (células T) y fue inversamente proporcional a las reducciones del número relativo de células DR⁺ (células B).

Panel CD56& 16 y CD3

Los marcadores CD56&CD16 se encuentran en un grupo heterogéneo de células, un subconjunto de linfocitos conocido generalmente como linfocitos granulares grandes y linfocitos citolíticos naturales. El antígeno CD16 se expresa en virtualmente todos los restantes linfocitos citolíticos naturales y está débilmente expresado en algunos linfocitos T con CD3⁺ entre ciertos individuos. Este antígeno se encuentra en granulocitos, en cantidades bajas y está asociado con los linfocitos con gránulos azurofílicos grandes. El antígeno CD16 es el receptor III del FC IgG.

Un número variable de linfocitos CD16⁺ coexpresan, o bien el antígeno CD57 o bien el antígeno CD8 de baja densidad, o ambos. En la mayoría de las personas, no existe virtualmente superposición con otros antígenos de los linfocitos T, como por ejemplo los antígenos CD5, CD4 o CD3. El antígeno CD56 está presente en prácticamente todos los linfocitos citolíticos naturales de CD16⁺ en reposo y activados y estos subconjuntos de células desarrollan una citotoxicidad no importante del complejo de histocompatibilidad restringido.

La inmunofenotipia de las muestras de sangre tratadas y no tratadas de pacientes con B-CLL y algunos otros pacientes con otros trastornos mostró un incremento del número relativo de células que coexpresaban los antígenos CD56&CD16 los cuales se presentaban muy granulados y con un tamaño medio (véase la Tabla 5 y las Gráficas 1, 2, 3 & 4). Estas observaciones fueron también acompañadas por un incremento marcado del número relativo de células que expresaban solo el antígeno CD3 (sin la expresión de los marcadores CD56 y CD16), y de las células que coexpresaban los marcadores CD56&CD16 y CD3 conjuntamente.

En la Tabla 5 los números de paciente 2, 3 y 4 representan la misma muestra de sangre pero analizada a las 2 horas, 6 horas y 24 horas, respectivamente (antes y después del tratamiento). Esta muestra enseña que el tratamiento de sangre con un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR parece provocar la producción espontánea de células CD56⁺ y CD16⁺, células CD3⁺ y CD56⁺ y células CD16⁺ y CD3⁺ y estas observaciones estuvieron siempre acompañadas por la desaparición de los marcadores de células B (CD19, DR, CD56, CD16⁻, CD3⁻).

El análisis progresivo de estas muestras de sangre antes y después del tratamiento mostró que los niveles de las células de CD56⁺ y CD16⁺ decrecían con el tiempo y que el nivel de células CD3⁺ aumentaba con el tiempo.

Las muestras de sangre del paciente 7 con B-CLL, no muestra ningún cambio en el número de células que expresan los antígenos CD56, CD16 y CD3 en comparación con los cambios inmunofenotípicos observados en muestras tratadas y no tratadas y esto es porque la cantidad del anticuerpo monoclonal añadido fue extremadamente baja con respecto al número de linfocitos B. Sin embargo, el tratamiento de la muestra de sangre de este paciente en una ocasión distante con una cantidad apropiada del anticuerpo monoclonal mostró incrementos considerables del número relativo de células CD3⁺ CD56⁺ & CD16⁺ y CD56⁺ y CD16⁺ y CD16⁺ CD3⁺.

Las muestras de sangre de otros pacientes con otras anomalías mostraron cambios variables en el nivel de estas células y ello parece depender del número de linfocitos B presentes en la sangre antes del tratamiento, la duración del tratamiento y probablemente la condición clínica de los pacientes.

35 *Panel CD45 y CD14*

El antígeno CD45 está presente en todos los leucocitos humanos, incluyendo los linfocitos, los monocitos, las células polimorfonucleares, los eosinófilos y los basófilos de la sangre periférica, el timo, el bazo, y la amígdala, y los progenitores de leucocitos de la médula ósea.

El CD14 está presente en del 70% al 93% de los monocitos periféricos normales de la sangre, en del 77% al 90% de los fagocitos de los fluidos pleural y peritoneal. Este antígeno está débilmente expresado en granulocitos y no existe en linfocitos no estimulados, linfocitos T activados por mitógenos, eritrocitos o plaquetas.

El antígeno CD45 representa una familia de las fosfatases de la tirosina proteínica y esta molécula interactúa con estímulos externos (antígenos) y efectúa la transferencia de señales por medio de los miembros de la familia Src que conducen a la regulación del crecimiento celular y la diferenciación.

La conexión de la cadena β de los antígenos DR en muestras de sangre tratadas, especialmente las obtenidas de pacientes con B-CLL, sugiere que dicho tratamiento afecta al nivel de los antígenos CD45 existente en los linfocitos B. Los cambios inmunofenotípicos globales que tienen lugar con la estimulación de la cadena β del antígeno DR parecen originar diferentes tipos de células que pueden ser segregadas sobre la base del nivel de la expresión del CD45 y del CD14 así como de la morfología según se determina mediante la dispersión hacia delante y la dispersión lateral (tamaño y granulación, respectivamente) y estos resultados se presentan en la Tabla 6 y en las Gráficas 1, 2, 3 & 4). Véase también la Figura 7 que demuestra la aparición de las células CD45⁻ CD14⁻ después del tratamiento con el anticuerpo CD3/43. Estas células no son células hematopoyéticas.

Con el tratamiento del dispositivo de acuerdo con la presente invención el número relativo de células con CD45bajo (en comparación con las muestras no tratadas) aumentó de manera considerable y lo mismo hizo el número relativo de células que coexpresaban los antígenos CD45 y CD14. Este tipo de cambios inmunofenotípicos coincidió con la reducción del número relativo de células con CD45alto (en comparación con las muestras no tratadas). Sin embargo esta última población de células puede dividirse más sobre la base de la morfología y el grado de expresión del CD45. Un tipo fue extremadamente grande y tenía niveles extremadamente altos del antígeno CD45 en comparación con el resto de las células presentes en las gráficas (véanse las Gráficas 1, 2, 3 y 4) tras el análisis de estas pruebas después del tratamiento con el paso del tiempo (véase la Tabla 6, paciente 2, 3 y 4 y la Gráfica 1) el número relativo de células CD45⁺ cayó inicialmente de manera drástica con el paso del tiempo para originar células con CD45bajo. Sin embargo, el análisis de sangre 24 horas más tarde mostró la situación opuesta.

Las muestras 5 y 7 revelan cambios inmunofenotípicos opuestos a los obtenidos con otras muestras obtenidas de otros pacientes con B-CLL y esto es porque las muestras fueron analizadas en un tiempo de incubación muy anterior con el anticuerpo monoclonal. De hecho, el análisis secuencial de las muestras de sangre después del tratamiento parece sugerir que los cambios inmunofenotípicos emprendidos por los linfocitos B dependen del tiempo porque representan una etapa de desarrollo y los cambios inmunofenotípicos medidos en el tiempo X no va a ser el mismo en el tiempo X plus (no es fijo una vez inducidos). Sin embargo, estos tipos de cambios deben producirse de una manera más restringida en el cuerpo, en caso contrario a continuación se produciría una inmunopatología. El efecto del tratamiento de muestras de sangre de otros pacientes sin malignidad de células B muestra cambios variables de los inmunofenotipos de las células y ello se debe a que los linfocitos B están presentes en una cantidad inferior. Sin embargo, el tratamiento de fracciones enriquecidas de linfocitos B obtenidos de donantes de sangre sanos muestran cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos con B-CLL con recuentos de linfocitos B altos.

Panel CD8 y CD3

El determinante antigénico CD8 interactúa con las moléculas del MHC de la clase I, produciendo una adhesión incrementada entre los linfocitos T CD8⁺ y las células escogidas como objetivo. Este tipo de interacción potencia la activación de los linfocitos en reposo. El antígeno CD8 está acoplado a una quinasa de tirosina proteínica (p56lck) y a su vez el complejo CD8/p56lck puede jugar un papel en la activación de los linfocitos T.

El tratamiento de muestras de sangre del dispositivo de acuerdo con la invención obtenidas de pacientes con B-CLL con anticuerpo monoclonal frente a la cadena β provocó un considerable incremento del número relativo de células positivas CD3CD8 y CD3 (muy probablemente siendo CD4 CD3) indicando de esta forma más claramente que las células positivas dobles generadas inicialmente están experimentando un desarrollo hacia linfocitos T maduros. Este es un proceso que puede ser medido directamente por los antígenos CD19 y DR e indirectamente por los antígenos CD8' CD3'. La valoración seriada de las muestras de sangre tratadas del mismo paciente con el paso del tiempo parece estar de acuerdo con un proceso idéntico al desarrollo de los timocitos (Tabla 7, paciente 2, 3 y 4 y Gráfica 1).

El número relativo de células CD8⁺ aumentó con el tiempo en las muestras tratadas y no tratadas pero en una medida mayor que las muestras tratadas. Por otro lado, el número relativo de células CD8⁺ CD3⁺ decreció con el paso del tiempo en las muestras no tratadas. Sin embargo, el número relativo de células CD3⁺ aumentó en las muestras de sangre tratadas cuando fueron medidas con el paso del tiempo y este tipo de células se corresponde en gran medida con las células positivas simples CD4⁺ CD3⁺; una forma más madura de timocitos. Así mismo, dado que estas muestras fueron también inmunofenotipadas con otras pruebas (mencionadas con anterioridad en las Tablas 3, 4, 5 y 6), los cambios globales incriminan en grado sumo a las células B en la creación de progenitores y proles de linfocitos T.

Las muestras de sangre de un paciente con B-CLL (número 2, 3 y 4, Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) en porciones separadas fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal conjugado de la PE sin valor frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR y forma no conjugada del mismo anticuerpo monoclonal. Tras la comparación de la PE conjugada, el tratamiento claramente indica que no hay ningún cambio en el número relativo de las células positivas CD3 y de los marcadores asociados, como por ejemplo el CD4, que se ha observado que presenta niveles significativos cuando la misma muestra de sangre fue tratada con una forma no conjugada del anticuerpo. Sin embargo, se apreció un incremento del número de células positivas CD45 sin que se expresara el antígeno DR sobre su superficie cuando fue medido con el paso del tiempo (véase la Tabla 8). Un hallazgo que fue similar al observado en las muestras no tratadas cuando fueron inmunofenotipadas con el paso del tiempo (Tabla 6). Así mismo, el número relativo de células que expresaban un CD45bajo decreció con el tiempo, un fenómeno que también se observó en las muestras no tratadas (cuando fueron medidas con el paso del tiempo) del mismo paciente (véase la gráfica 1A).

Análisis FAC de células derivadas de muestras de capas leucocíticas humanas

El tratamiento de muestras de capas leucocíticas en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con un anticuerpo monoclonal Cur3/43 dio como resultado una incidencia mayor del CD34 (marcador de células madre) y una incidencia menor del CD19 (marcador de linfocitos B)-véase la Tabla 21.

Los ensayos de formación de colonias revelaron que en las muestras no tratadas, la colonia no predominante fue de tipo eritroideo, mientras que la variación en el tipo de colonia en las muestras tratadas fue mucho mayor siendo el tipo de colonia principal colonias de células pluripotentes, observándose así mismo la formación de unidades de granulocitos macrófagos, y megacariocitos conjuntamente con la colonia eritroidea.

Estos resultados demuestran que las células tratadas son mucho más capaces de poder diferenciarse a lo largo de otras vías linfohematopoyéticas dando como resultado una diversidad de líneas de células especializadas.

C. Comparación del efecto de otros anticuerpos monoclonales con especificidad diferente sobre la linfopoyesis de linfocitos T

Panel CD19 y CD3

El tratamiento de muestras de sangre en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno DR y frente a la región homóloga de los antígenos de Clase I del HMC redujo el número de células CD3⁺ e incrementó el número de células CD19⁺. El tratamiento de la misma sangre con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR redujo el número de células CD19⁺ e incrementó el número de células CD3⁺. El tratamiento con el último anticuerpo monoclonal con ciclofosfoamida reveló el mismo efecto (Tabla 14, paciente 5/6 con B-CLL a las 2 hr de tratamiento).

Los análisis posteriores de las células CD19⁺ y CD3⁺ en las mismas muestras revelaron incrementos adicionales del número relativo de células CD3⁺ solo en la sangre tratada con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR (Tabla 14, paciente 5/6 a las 24 horas después del tratamiento). Sin embargo, los análisis posteriores (24 horas después del paciente 5/6 Tabla 14) de muestras de sangre tratadas con ciclofosfoamida más el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR muestran la inversión del número relativo de células CD19⁺ y CD3⁺ en comparación con la mostrada a las 2 horas del tiempo de incubación bajo exactamente la misma condición.

En general, el tratamiento de muestras de sangre del mismo paciente con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno DR o del anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno de clase I muestra un aumento relativo de células CD19⁺ (marcador total B) en comparación con la muestra no tratada. El número relativo de células CD19⁻ CD3⁻ se redujo ligeramente en muestras de sangre tratadas con anticuerpo monoclonal frente a la cadena α del antígeno DR o tratada con el anticuerpo monoclonal frente a los antígenos de la clase I (véase la Tabla 14 & Gráficas 2, 3 & 4). El tratamiento de las muestras de sangre del paciente 09 con el anticuerpo monoclonal frente a los antígenos de clase I incrementó el número relativo de células CD3⁺ y redujo ligeramente el número relativo de células CD19⁺ y CD19⁻ CD3⁻. Sin embargo, el tratamiento de una preparación enriquecida de linfocitos B obtenida de donantes de sangre sanos con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β o la cadena α del antígeno DR mostró cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos con el paciente con B-CLL.

El tratamiento de los pacientes con VIH⁺ y con deficiencia de IgA con anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR incrementó el número relativo de células CD3⁺ y redujo el número relativo de células CD19⁺. Sin embargo, el tratamiento de la misma muestra de sangre con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga del antígeno de clase I no produjo el mismo efecto. El tratamiento de muestras de sangre obtenidas de pacientes (34/BD y 04/BD) con deficiencia de células B mostró cambios inmunofenotípicos variables al ser tratados con anticuerpos monoclonales frente a la cadena β del antígeno DR, de antígenos de clase I y del antígeno CD4.

Panel CD4 y CD8

Las muestras de sangre analizadas utilizando las pruebas CD19 y CD3 (Tabla 14) fueron también inmunofenotipadas con las pruebas CD4 y CD8 (Tabla 15). Ambas pruebas parecen estar de acuerdo y refrendarse entre sí. La incubación durante dos horas de las muestras de sangre de pacientes con B-CLL (Tabla 15, pacientes 5, 6 y 10, Gráficas 2, 3 & 4) con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR o con este anticuerpo monoclonal más ciclofosfoamida incrementó el número relativo de células CD8⁺ y CD4⁺ y de células que coexpresaban ambos marcadores. Por otro lado, el tratamiento de las mismas muestras con anticuerpos monoclonales frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno DR o de la región homóloga de la cadena α del antígeno de clase I no produjo los mismos efectos.

La comparación de las tendencias inmunofenotípicas obtenidas en periodos de incubación de 2 horas y 24 horas con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR más ciclofosfoamida reveló cambio inversos en el número relativo de células positivas CD4 y CD8 (Tabla 15, paciente 5/6 con B-CLL a las 2 horas y a las 24 horas) y dichos cambios concordaron con los obtenidos cuando la misma muestra de sangre fue analizada con las pruebas CD19 y CD3 (Tabla 14 del mismo paciente). Hallazgos posteriores indican que la diferenciación subsecuente es reversible en cuanto las células indiferenciadas pueden diferenciarse en linfocitos T o linfocitos B.

Pruebas DR y CD3

Los cambios inmunofenotípicos obtenidos con las pruebas DR y CD3 (Tabla 16) confirman los hallazgos obtenidos con las pruebas CD19 y CD3 y con las pruebas CD4 y CD8 (Tablas 14 & 15 & Gráficas 2, 3 & 4) que siguieron al tratamiento de las mismas muestras de sangre con anticuerpos monoclonales frente a la región homóloga del lado β o α del antígeno DR o del anticuerpo monoclonal frente a los antígenos de clase I o del anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR más ciclofosfoamida en análisis de 2 horas.

De los resultados, se derivaría que el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR es muy capaz de arrastrar la reducción de células positivas CD3 a partir de las células DR⁺.

Así mismo, tratamientos como los que conllevan la conexión de la cadena α de los antígenos DR o la conexión del lado β de la molécula en combinación con ciclofosfoamida (prolongado tiempo de incubación) promovieron incrementos en el número relativo de células CD19⁺ o células DR⁺.

5 *Panel CD56 & 16 y CD3*

El tratamiento de muestras sanguíneas en un dispositivo de acuerdo con la presente invención, especialmente de aquellos pacientes con B-CLL con recuentos de linfocitos B con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR incrementó el número relativo de células positivas CD56 & 16.

10

En estos pacientes, el número relativo de células CD3⁺ y CD56⁺ y CD16⁺ CD⁺ también se incrementó después del tratamiento de muestras de sangre con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β confirmando afirmaciones anteriores observadas con el mismo tratamiento cuando las mismas muestras de sangre fueron analizadas con las pruebas CD3 y CD19 y DR y CD3.

15

Panel CD45 y CD14

Las muestras de sangre tratadas en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con anticuerpos monoclonales frente a las cadenas β o α del antígeno DR o frente a la cadena β más ciclofosfoamida o los antígenos de clase I fueron también analizadas con las pruebas CD45 y CD14 (Tabla 18). La delimitación del CD45bajo, CD45alto y CD45medio es arbitraria. El tratamiento de las muestras de sangre 5/6 (en 2 horas) con anticuerpos monoclonales frente a la cadena β del antígeno DR o con el anticuerpo monoclonal más ciclofosfoamida generó células CD45⁺ bajo e incrementó el número relativo de las células CD45⁺ medio. Sin embargo, el anterior tratamiento incrementó el número relativo de células CD45⁺ alto y el último tratamiento redujo el número relativo de células CD45⁺ medio y estos cambios se manifestaron como dependientes del tiempo.

25

Las muestras de sangre de los pacientes 5/6 y 10 (B-CLL) tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal frente a los antígenos de clase I mostraron una reducción en el número relativo de células de CD45⁺ medio y similares observaciones fueron apreciadas en las muestras de sangre 09 y de VIH⁺ después del mismo tratamiento en comparación con las muestras no tratadas. El tratamiento de las muestras de sangre de pacientes con VIH⁺ e IgA/D con el anticuerpo monoclonal frente al antígeno de clase I incrementó el número relativo de células CD45⁺ bajo en comparación con las muestras no tratadas o las muestras tratadas con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno DR. Sin embargo las muestras de sangre de estos pacientes mostraron una reducción del número relativo de células CD45⁺ medio tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal frente a las regiones homólogas de la cadena β del antígeno DR. Las células CD45⁺ medio se incrementaron en las células de sangre del paciente con IgA/D después del anticuerpo monoclonal frente al antígeno de la clase I. Las células que fueron extremadamente grandes, intensamente granulares y que expresaban niveles intensos del antígeno CD45 fueron observadas en las muestras de sangre tratadas con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR de las antígenos de clase II del MHC (véanse Gráficas 1, 2, 3 & 4).

40

Panel CD8 y CD28

El antígeno CD28 está presente en, de modo aproximado, del 60% al 80% de los linfocitos T (CD⁺) de la sangre periférica, en el 50% de los linfocitos T de CD8⁺ y en el 5% de los timocitos CD3⁺ inmaduros.

45

Durante la maduración de los timocitos, la expresión del antígeno CD28 aumenta desde una baja densidad sobre la mayoría de los timocitos inmaduros CD4⁺ CD8⁺ a una densidad más alta sobre virtualmente todos los timocitos maduros CD3⁺ CD4⁺ o CD8⁺. La activación celular aumenta en mayor medida la densidad del antígeno CD28. La expresión del CD28 también divide los linfocitos CD8⁺ en dos grupos funcionales. Los linfocitos CD8⁺ median en la citotoxicidad aleanfígena específica, que está restringida a la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La supresión de la proliferación de células es medida por el subconjunto CD8⁺ CD28⁻. El antígeno CD28 es una molécula de adhesión celular y actúa como un ligando del antígeno B7/BB-1 el cual está presente en los linfocitos B activados.

50

El tratamiento de las muestras de sangre de un dispositivo de acuerdo con la presente invención de pacientes (Tabla 19, pacientes 5/6 y 8) con B-CLL con el anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR incrementó el número relativo de células CD8⁺, CD28⁺ y CD8⁺ CD28⁺ y todos los demás tipos de tratamiento no lo hicieron.

55

60 *Panel CD34 y CD2*

El antígeno CD34 está presente en las células precursoras hematopoyéticas inmaduras y en todas las células constitutivas de la colonia hematopoyética de la médula ósea, incluyendo los progenitores unipotentes (CFU-GM, BFU-E) y pluripotentes (CFU-GEMM, CFU-Mix y CFU-blast). El CD34 también se expresa en los precursores de células estromales. Los precursores linfocitos T y B de la transferasa deoxinucleotidílica terminal (TdT)⁺ del hueso normal son CD34⁺. El antígeno CD34 está presente en células mieloideas tempranas que expresan el antígeno CD33 pero carecen de los antígenos CD14 y CD15 y en células eritroideas tempranas que expresan el antígeno CD71 y débilmente expresan el antígeno CD45. El antígeno CD34 también se encuentra en las células endoteliales capilares y

65

aproximadamente en un 1% de los timocitos humanos. Los linfocitos sanguíneos periféricos, los monocitos, los granulocitos y las plaquetas no expresan el antígeno CD34. La densidad del antígeno CD34 es más elevada en células progenitoras hematopoyéticas tempranas y decrece cuando las células maduran. El antígeno está ausente en células hematopoyéticas completamente diferenciadas.

5 Las células progenitoras CD34⁺ no comprometidas son CD38⁻ DR⁻ y carecen de antígenos de linaje específico, como por ejemplo CD71, CD33, CD10, y CD5, mientras que las células CD34⁺ que son de linaje comprometido expresan el antígeno CD38 con elevada densidad.

10 La mayoría de las células CD34⁺ expresan recíprocamente, ya sea el antígeno CD45ro o bien el CD45ra. Aproximadamente el 60% de la leucemia mieloide aguda y de la linfocitosis B aguda expresa el antígeno CD34. El antígeno no es expresado en la leucemia linfocítica crónica (linaje B o T, o en los linfomas). El antígeno CD2 está presente en los linfocitos T y en un subconjunto de linfocitos citotóxicos naturales.

15 Los resultados se muestran en las Gráficas 2, 3 y 4.

El análisis de muestras de sangre de un paciente con B-CLL (Tabla 20, paciente 5/6 a las 2 horas) después del tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a la cadena β del antígeno DR o frente a la cadena α del mismo antígeno reveló aumentos acusados en el número relativo de células CD34⁺ y CD34⁺ CD2⁺ después del tratamiento con el anticuerpo anterior. Dado que las muestras de sangre fueron inmunofenotipadas con las pruebas mencionadas con anterioridad (véanse las Tablas 14 a 19) para otros marcadores, el incremento del número relativo de las células CD34⁺ y CD34⁺ CD2⁺ observado aquí parece coincidir con los incrementos del número relativo de las células relativas simples (SP) CD4⁺ CD8⁺, CD5⁺ CD3⁺ y CD4⁺ CD3⁺. Así mismo, estos hallazgos que parecen exclusivos de la conexión de la cadena β del antígeno HLA-DR suponen un apoyo directo a que el proceso está originando una linfopoyesis T por medio de la regresión de linfocitos B.

Al analizar el mismo tratamiento 24 horas más tarde las células CD34⁺ parecieron reducir sus niveles para originar un incremento adicional en el número relativo de linfocitos T. El proceso de retrodiferenciación que inicialmente originó una linfopoyesis T puede invertirse para originar una linfopoyesis B. El fenómeno anterior fue observado en un tiempo de incubación de 2 horas con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR más ciclofosfoamida, mientras que el proceso último fue observado en un tiempo de incubación de 24 horas con el mismo tratamiento de la misma muestra (Gráfica 2).

El tratamiento de muestras de sangre de paciente con VIH⁺ (Tabla 20, paciente VIH⁺) con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR incrementó de forma acusada el número relativo de las células CD34⁺ y CD2⁺ CD34⁺ y lo mismo hizo el tratamiento de la misma muestra de sangre con el anticuerpo monoclonal de la cadena β del antígeno HLA-DR y el anticuerpo monoclonal frente a la cadena α del mismo antígeno cuando se sumaron entre sí. Sin embargo, el tratamiento de esta muestra de sangre con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena α del antígeno HLA-DR no afectó al nivel de las células CD34⁺. El tratamiento de las muestras de sangre obtenidas de un bebé de 6 días (BB/ST Tabla 20) que fue investigado en ese tiempo con relación a la leucemia y tenía un número muy alto de células (blastos) atípicas en la sangre con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR o el anticuerpo monoclonal frente a la cadena α del mismo antígeno o de ambos anticuerpos monoclonales sumados entre sí, dieron como resultado los cambios inmunofenotípicos siguientes.

Tras el análisis de las muestras de sangre no tratadas el número relativo de células CD34⁺ y DR⁺ se incrementó de manera acusada y tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β el número relativo de células CD34⁺ se incrementó en mayor medida pero se apreció que se reducía tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena α del antígeno HLA-DR o con el tratamiento con los anticuerpos monoclonales frente a las cadenas α y β de la molécula cuando se sumaron entre sí. Sin embargo, el último tratamiento incrementó el número relativo de células CD34⁺ CD2⁺ y lo contrario ocurrió cuando la misma muestra de sangre fue tratada solo con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR. Tras el análisis de porciones tratadas y no tratadas de sangre del mismo paciente 24 horas después, el número relativo de células CD34⁺ se redujo con todos los tratamientos mencionados con anterioridad excepto que se mantuvo con un nivel mucho más alto con el tratamiento con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR. El último tratamiento continuó reduciendo el número relativo de células CD34⁺ CD2⁺ 24 horas más tarde.

Estos resultados indican que la conexión del antígeno HLA-DR a través de la cadena β promueve la producción de más células CD34⁺ a partir del grupo CD2⁺ CD34⁺ o a partir de tipos más maduros de células, como por ejemplo los linfocitos B de pacientes con B-CLL y estos resultados indican que este tipo de tratamiento promueve la retrodiferenciación. Sin embargo, el inmunofenotipado de muestras de sangre 24 horas después sugiere que estos tipos de células parecen existir en un tipo totalmente distinto de linaje y en este caso las células parecen existir o más bien comprometerse ellas mismas con el linaje mieloide que fue observado en el análisis de la muestra de sangre tratada con las pruebas CD7 y CD13 & 33.

La morfología cambia las características inmunofenotípicas de los linfocitos B de la B-CLL y las fracciones enriquecidas de los individuos sanos (utilizando microesferas de CD19) tras el tratamiento con los anticuerpos monoclonales frente a las regiones homólogas de la cadena β de los antígenos de clase II del HMC. Estos fueron acompañados por un cambio de la morfología de los linfocitos B. Se observó que los linfocitos B colonizaban frotis de vidrio de

extensiones de sangre no tratada y fueron sustituidos por granulocitos, monocitos, grandes números de células de apariencia primitiva y glóbulos rojos nucleados. No se observaron cifras mitóticas o muerte de células apreciables en las extensiones de sangre tratadas o no tratadas.

- 5 Los resultados de la Tabla 20 demuestran también un hallazgo importante adicional en el sentido de que, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, es posible preparar una célula indiferenciada mediante la retrodiferenciación de una célula indiferenciada más madura.

10 D. *Imágenes al microscopio*

Además de las pruebas antigénicas de acuerdo con lo referido con anterioridad, el procedimiento de la presente invención fue seguido visualmente utilizando un microscopio. El dispositivo de la presente invención puede ser programado para rastrear los cambios automáticamente mediante medios de rastreo.

- 15 En este sentido, la Figura 8 es una imagen al microscopio de células B diferenciadas antes del procedimiento de la presente invención. La Figura 9 es una imagen al microscopio de células indiferenciadas constituidas mediante la retrodiferenciación de las células B de acuerdo con la presente invención, en la que el agente era un anticuerpo monoclonal frente a las regiones homólogas de la cadena β del antígeno HLD-DR. Las células indiferenciadas son los
20 racimos de células teñidas de oscuro. La Figura 10 es una imagen al microscopio de las mismas células indiferenciadas pero con una ampliación inferior.

Las Figuras 8 a 10, por consiguiente, demuestran visualmente la retrodiferenciación de las células B en células madre indiferenciadas mediante el procedimiento de la presente invención.

- 25 La Figura 11 es una imagen al microscopio de células B diferenciadas antes del procedimiento de la presente invención. La Figura 12 es una imagen al microscopio de células indiferenciadas constituidas mediante la retrodiferenciación de las células B de acuerdo con la presente invención, en el que el agente utilizado fue un anticuerpo monoclonal frente a las regiones homólogas de la cadena β del antígeno HLA-DR. De nuevo aquí, las células indife-
30 renciadas son racimos de células teñidas de oscuro. La Figura 13 es una imagen al microscopio de la constitución de células granulocíticas diferenciadas a partir de las mismas células indiferenciadas de la Figura 12.

- Las Figuras 11 a 13, por consiguiente, demuestran visualmente la retrodiferenciación de las células B en células madre indiferenciadas mediante el procedimiento de la presente invención seguida por el compromiso de las células
35 indiferenciadas en nuevas células diferenciadas que son de un linaje diferente de las células diferenciadas originales.

- Estos experimentos de microscopia se han llevado también a cabo con sangre de pacientes con B-CLL tratados con el anticuerpo monoclonal CD3/43 de acuerdo con lo descrito con anterioridad. Como se expuso con anterioridad, la sangre de las células con B-CLL es una ayuda útil en el estudio del proceso de retrodiferenciación, porque la sangre
40 contiene un número de linfocitos B más alto que el normal. Los resultados se muestran con detalle en las Figuras 14 a 17.

- La Figura 14 muestra en dos diferentes ramificaciones, una muestra de sangre no tratada de un paciente con B-CLL. Los linfocitos B no tratados (células azules) muestran la morfología típica, esto es, la estructura cromatídica condensada y citoplasma disperso. Las células restantes son eritrocitos (glóbulos rojos).
45

El tratamiento de las muestras de sangre con el anticuerpo CD3/43 conduce inicialmente al arracimamiento de los linfocitos B en agregados (Figura 15).

- 50 Las células B arracimadas pierden gradualmente su morfología típica, caracterizada por la formación de áreas de células en forma de guijarros, la descondensación de la estructura cromática, la aparición de nucleolos prominentes, la ampliación del volumen celular y la basofilia citoplasmática típica de las células indiferenciadas (Figura 16). La estructura cromatídica relajada (descondensada) es una característica importante de las células indiferenciadas en comparación con las células diferenciadas. Ello es probable que se deba a la necesidad de un acceso más extensivo
55 a las unidades transcripcionales para determinar los cambios en la expresión génica requeridos para el compromiso a lo largo de un linaje celular determinado. Por el contrario, es bien sabido que la célula más diferenciada tiene una estructura cromatídica más condensada, dado que una pequeña cantidad de cromatina necesita ser transcripcionalmente activa.

- 60 La aparición de las células indiferenciadas va siempre acompañada por la aparición de las células (17A a 17J) con morfología diferenciada. Importa destacar que estas células no podrían haber surgido mediante proliferación, dado que (i) el tiempo de la incubación fue demasiado corto para que tuviera lugar una o más divisiones celulares completas (ii) no se aprecian figuras mitóticas y (iii) el número absoluto de leucocitos permaneció siendo el mismo antes y después del tratamiento. Así mismo, fueron observados progenitores menos diferenciados en combinación con sus proles más
65 diferenciadas (véase el precursor mieloide de la Figura 17J), indicando que estas células especializadas surgieron mediante diferenciación.

Las micrográficas de las Figuras 17A a 17J muestran los tipos de células diferenciadas vistas después del tratamiento de linfocitos B-CLL con anticuerpos monoclonales CR3/43: Plaquetas (PI)-Figura 17A, Neutrófilos (Ne)-Figura 17B, Eosinófilos (Eso)-Figura 17C, Megacariocitos (Meg)-Figura 17D, Basófilos (Ba)-Figura 17G, Linfocitos (Ly)-Figura 17H, Monocitos (Mo)-Figura 17I y Progenitores Mieloideos (Mp)-Figura 17J. También se apreciaron progenitores eritroideos y macrófagos (datos no mostrados).

Así, en resumen, los resultados de la microscopia muestran cambios en la morfología de las células B de las muestras de los pacientes con B-CLL, quienes tienen niveles altos de linfocitos B maduros. Las imágenes al microscopio muestran cambios en la morfología de los linfocitos B, los cuales inicialmente se arraciman, seguido por la aparición de diversas células con una extensión graduada de morfologías desde células progenitoras a células diferenciadas (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariocitos, plaquetas, linfocitos, macrófagos, granulocitos, granulocitos encayado y células en forma de estroma).

Así mismo, y ello es muy importante, se aprecia la presencia de progenitores eritroideos y mieloideos (Figura 17J y datos no mostrados). El progenitor mieloideo es claramente distinguible desde el punto de vista morfológico de las otras células, siendo de mayor tamaño y con una morfología nuclear específica y que contiene también gránulos citoplasmáticos.

Los datos del microscopio, por consiguiente, ofrecen apoyo desde el punto de vista morfológico a lo que los datos de citometría de flujo indican en términos de marcadores de superficie celular. Estos datos permiten concluir que el tratamiento de linfocitos B con un anticuerpo frente a la cadena β del HLA-DR del MHC se traduce en una reducción del número de linfocitos B y en un incremento del número de células de otros linajes hematopoyéticos incluyendo células precursoras inmaduras.

La retrodiferenciación de células T tratadas con un anticuerpo frente a una cadena α de clase II del HMC (anticuerpo monoclonal TAL. 1B5) en células madre indiferenciadas mediante el procedimiento de la presente invención seguida mediante el compromiso de las células indiferenciadas en células diferenciadas que son de diferente linaje que las células diferenciadas originales fue también seguida mediante microscopia (datos no mostrados).

E. Análisis de las redistribuciones de recombinación de los segmentos VDJ en linfocitos retrodiferenciados

A modo de telón de fondo, las células diferenciadas utilizadas en estos experimentos (linfocitos B o células con ciertas propiedades de los linfocitos T) tienen genes que han experimentado la redistribución para codificar un Ig maduro o un TCR, respectivamente. En el proceso o redistribución, las porciones intermedias del ADN que no son parte del gen de TCR o Ig expresados, básicamente el ADN que está entre el segmento de codificación de la región variable (V) y el segmento de codificación de la región constante (C) son separados del genoma. Estos fragmentos escindidos son retenidos en la célula bajo la forma de ADN extracromosómico. Para las células que se retrodiferencian realmente, el ADN escindido resultaría reinsertado en el genoma, situando las células en un estado similar al que precede a su diferenciación original. Debido a ello, una sonda complementaria a una secuencia del gen redispuesto se esperará que hibridice en un fragmento de restricción del ADN de mayor tamaño cuando el ADN haya retornado a su estado de línea no redispuesta o germinal en comparación con el ADN redispuesto que caracteriza el estado diferenciado.

1. Redistribución de los genes TCR en las células Daudi

En el experimento que se traduce en la transferencia electrosférica de Southern de la Figura 18, una línea celular bien conocida, Daudi, se utilizó un linfoma de células B con un gen TCR redispuesto (y el otro suprimido). El ADN genómico fue preparado a partir de las células Daudi y reunido con EcoRi. Sometido a electroforesis en gel y sondado con una sonda del ADN de cadena β marcada con el TCR. Las células Daudi se utilizaron en vez de los linfocitos B purificados a partir de pacientes humanos porque estas células están desde el punto de vista clónico relacionadas y forman una población de células con las mismas redistribuciones génicas que pueden ser claramente visualizadas mediante la transferencia electrosférica de Southern del ADN genómico reunido. En una muestra de sangre normal, diferentes células tienen redistribuciones diferentes y, por lo tanto, la transferencia electrosférica de Southern aparecería como una extensión.

Un gen funcional que codifica la cadena β del TCR es reunido en linfocitos mediante una serie de redistribuciones somáticas que se producen durante la maduración de los linfocitos para reunir un segmento V, un segmento D y un segmento J. Una explicación muy clara de estos procesos de redistribución se ofrece en Genes VI, Lewin, Oxford University Press, 1997 (páginas 1994-1023)-un libro de texto estándar para estudiantes de medicina. Páginas concretas se citan *infra*.

En primer lugar, un segmento D es unido mediante un proceso de recombinación a uno de varios segmentos J en una reacción de unión D-J. A continuación, uno de los muchos posibles segmentos V (< 60) se une al segmento DJ resultante (unión V-D) para formar un gen de cadena β del TCR. El gen de región constante está inmediatamente corriente abajo del segmento VDJ redispuesto, aunque puede haber segmentos J intervinientes que son separados durante el procesamiento del ARN para situar el exón génico constante en proximidad con el segmento génico VDJ redispuesto (Lewin, p998).

En células humanas, hay dos segmentos génicos de región constante de cadena β del TCR diferentes, designados $C\beta 1$ y $C\beta 2$, presentes en dos loci diferentes, cada uno de los cuales está precedido por un racimo de 6 o 7 segmentos génicos de región de unión ($J\beta$) ($J\beta 1$ y $J\beta 2$) y un segmento D ($D\beta 1$ y $D\beta 2$) (véase la Figura 1, Toyonaga *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8624-8628 y Lewin, p1017).

La recombinación de episodios que conducen a los segmentos V, D y J-C situados en proximidad son catalizados por una multitud de proteínas, incluyendo las RAG-1 y RAG-2 las cuales reconocen las secuencias nomaméricas y heptaméricas presentes en los extremos recombinantes de las secuencias génicas V, D y J-C. Dependiendo de la orientación de las secuencias nomaméricas/heptaméricas, la recombinación se traduce en una inversión o una supresión. Ambos tipos de episodios darán como resultado un cambio en la pauta de los fragmentos enzimáticos de restricción del ADN genómico. Así mismo, un episodio de supresión no se traduce necesariamente en una pérdida completa del fragmento escindido. Por el contrario, los extremos del fragmento escindido vuelven a unirse para producir un círculo de ADN que permanece en la célula (Okazaki *et al.*, 1987, Cell. 49: 477-85; Davis *et al.*, 1991, J. Exp. Med. 173: 743-6; Livak y Schatz, 1996, Mol. Cell Biol. 16: 609-18; Harriman *et al.*, 1993, Annu Rev Immunol, 11: 361-84). Cada segmento génico, por supuesto, tiene dos alelos dado que las células tienen un complemento cromosómico diploide.

En el estado de la línea germinal normal, los genes $C\beta 1$ y $C\beta 2$ están dispuestos como se muestra en la Figura 1, Toyonaga *et al.*, 1985. Una reunión de restricciones del ADN genómico con EcoRI generará dos bandas relevantes detectables por la sonda utilizada en el experimento (es un fragmento del ADN marcado derivado del $C\beta 1$ el cual también se hibridiza en $C\beta 2$ debido a un grado elevado de homología de secuencias): (i) una banda kb12 con la secuencia $C\beta 1$; y (ii) una banda kb4 con la secuencia $C\beta 2$. Esta configuración de línea germinal se aprecia en diferentes células inmaduras indiferenciadas (calle A de la Figura 18). Esta configuración de línea germinal se ilustra también perfectamente mediante la calle 3 (2 horas con el anticuerpo CR3/43) de la Figura 18, que ofrece una pauta idéntica a la de la calle A.

En el estado diferenciado ambos alelos de los genes $C\beta 1$ y $C\beta 2$ están redispuestos de tal manera que ya no hay un fragmento kb12 en el locus $C\beta 1$ o un fragmento kb4 en el locus del $C\beta 2$. De hecho, no existe fragmento hibridizante derivado del locus del $C\beta 1$ en el gel (esto se debe a la supresión de la secuencia hibridizante de ambos alelos $C\beta 1$ como resultado de la recombinación). En cuanto al locus del $C\beta 2$, hay en efecto ahora dos bandas importantes correspondientes a diferentes "alelos" derivados de las redistribuciones sobre ambos cromosomas. La banda de mayor tamaño, la cual es más pequeña que 4 kb corresponde a un fragmento de uno de los dos alelos redispuestos. La banda más pequeña es un fragmento del otro alelo redispuesto. La banda menor intermedia se deriva probablemente de un subclon de células Daudi con una redistribución diferente-de ahí su presencia en una cantidad submolar en uno y otro alelo. No obstante, el estado redispuesto se muestra muy claramente en la calle 1 donde ambas bandas principales son claramente visibles.

2 horas con el anticuerpo de control negativo (TAL. 1B5) que liga con la cadena α del MHC-DR se traduce de hecho en la pérdida de la banda superior, mientras que la banda inferior tiene una intensidad similar a las células no tratadas de la calle 1 (véase la calle 2). Una explicación posible para ello es que las células se están diferenciando, dando como resultado adicional un episodio de recombinación ulterior en el locus $C\beta 2$ de un alelo, lo que conduce a la pérdida de las secuencias del $C\beta 2$. Esto es totalmente consecuente con fenómenos conocidos.

24 horas con un anticuerpo de control negativo se manifiesta en la restauración de las tres bandas observadas en las células no tratadas (véase la calle 4). Sin embargo, las bandas de hecho migran a una posición más baja que las bandas observadas en la calle 2. No está suficientemente claro cómo se produce esto. Una explicación posible es que se ha producido la reintegración de las secuencias suprimidas, congruente con el modelo de reintegración escisión de salida de enlace (Malissen *et al.*, 1986, Nature 319: 28-32). No obstante ningún resultado observado en el anticuerpo TAL. 1B5 en 2 horas o 24 horas es indicativo de una redistribución hacia la pauta de línea germinal. Las calles 2 y 4 de hecho representan un control negativo-el anticuerpo frente a la cadena α no se traduce en una restauración de la secuencia de la línea germinal.

Frente a ello, los resultados obtenidos con un anticuerpo monoclonal (CR3/43) frente a la cadena β del MHC-DR después de dos horas muestran una pauta de bandas que se corresponde con la terminación de la línea germinal, a saber una banda de 12 kb y una banda de 4 kb (comparar la calle 3 con la calle A). En otras palabras, estos resultados muestran que la pauta de restricción de la línea germinal en los loci $C\beta 1$ y $C\beta 2$ ha sido restaurada para todos los alelos.

A partir de estos resultados concluimos que la pauta de bandas observada en la calle 3 es indicativa de una redistribución del ADN genómico de las células diferenciadas para regenerar la configuración de la línea germinal.

La importancia de esta conclusión no debe infravalorarse. Una redistribución genómica, con la inclusión de supresiones, puede resultar invertida para restaurar el genoma al estado en el que existía antes de que el proceso de diferenciación tuviera lugar. La explicación más probable es que la inversión provocada por la redistribución de los alelos $C\beta 2$ durante la diferenciación se ha invertido, y que la supresión de la frecuencia del $C\beta 1$ que provocó la pérdida de las bandas de 12 kb también ha resultado invertida. La fuente de la secuencia que falta del $C\beta 1$ probablemente se debe al ADN circular episómico presente en el núcleo procedente del episodio de supresión original. La existencia de este ADN circular ha sido catalogada en la técnica anterior (véanse las referencias citadas con anterioridad). No obstante, el mecanismo preciso mediante el cual se ha producido esta restauración del genoma de línea terminal no es importante. Lo que es importante es que se ha producido.

Una incubación continuada en el anticuerpo monoclonal (CR3/43) frente a la cadena β del MHC-DR durante 24 horas en el dispositivo de acuerdo con la presente invención da como resultado una pauta de bandas más compleja (calle 5). Sin embargo estas bandas no representan las mismas bandas que en el control no tratado. En particular, fragmentos de aproximadamente 12 kb que hibridizan con la sombra todavía están presentes (“alelos $C\beta 2$ ”). Así mismo, es importante apreciar que las bandas marcadas “alelos $C\beta 2$ ” no se corresponden con la banda más pequeña de 4 kb no observada en el control no tratado (calle 1). La explicación más probable de los resultados apreciados en la calle 5 es que se ha producido un proceso de redistribución secundario dado que la pauta de hibridación se asemeja a la de las células T en el sentido de que se caracteriza por un gen TCR redistribuido (esta explicación es congruente con los datos de la citometría de flujo que muestran un incremento de las células con marcadores celulares característicos de las células T). No obstante, con independencia de la explicación molecular precisa, los resultados apreciados en la calle 5 en una exposición de 24 horas al anticuerpo CR3/43 refrendan los resultados obtenidos en la exposición de 2 horas en la calle 3.

2. Redistribución del gen Ig en las células con B-CLL

La transferencia electroforética de Southern mostrada en la Figura 19B se obtuvo utilizando células sanguíneas periféricas de pacientes con leucemia linfocítica crónica (B-CLL). El ADN genómico fue preparado a partir de estas células B ampliamente monoclonales y reunidas con BamHI y HindIII, sometidas a electroforesis en gel y sondadas con una sonda del ADN del TCR marcado. Estas células con B-CLL fueron tratadas durante 24 horas con el CR3/43 (cadena anti clase II del MHC del HLA-DR, DP y DQ) lo que se describió con anterioridad. Las transferencias electroforéticas fueron sondadas con una sonda de la región J del Ig radiomarcado. Las dos bandas obtenidas de las células tratadas en la calle A representan los dos alelos Ig redistribuidos (paterno y materno). Estas bandas no aparecen en la calle B la cual muestra la pauta 24 horas después del tratamiento con anticuerpo de las células. En su lugar apareció una característica de banda de 5,4 kb del germinal del gen Ig.

En otro experimento mostrado en la Figura 19A, las células se dejaron sin tratar o fueron tratadas durante los tiempos indicados con el anticuerpo de cadena β del MHC anticlase II. La región VDJ del gen Ig fue amplificada por el PCR en el (control) diferenciado y las células con B-CLL tratadas con anticuerpo (mitad izquierda del gel). Esto generó un producto de amplificación de las VDJ a partir de las células no tratadas. Sin embargo, no se observó ninguna banda de este tipo en las células tratadas con anticuerpo porque, como resultado de la inserción del ADN genómico escindido, esta configuración del ADN de “línea germinal” no fue susceptible de amplificación por PRC utilizando los cebadores particulares para las VDJ. Un experimento similar (lado derecho del gel) permitió visualizar el comportamiento de una β -actina de control, de codificación génica de autorrutina. No había diferencia en el producto de amplificación por PRC de la β -actina, con independencia del tratamiento. De esta forma, este gen de “control” no pareció resultar afectado por el proceso de retrodiferenciación que provocó profundas alteraciones en el gen Ig de las mismas células bajo las mismas condiciones.

Los resultados presentados *supra* muestran que el tratamiento de células con un agente que conecta con un receptor de la superficie celular apropiado induce la retrodiferenciación de estas células que se demuestra en el nivel molecular (y se controla) mediante la observación de las redistribuciones del ADN cromosómico que caracterizan el estado diferenciado. De esta forma, se concluye, sobre la base de la evidencia genética y morfológica, que las células del linaje de linfocitos B tratadas con un agente (mAb) que conecta con la cadena β del MHC de clase II, experimentan la retrodiferenciación. Frente a ello, las mismas células tratadas con anticuerpos que conectan con la cadena α de clase II no resultan inducidos de manera similar para que se retrodiferencien. Como mucho, parecen diferenciarse (hacia delante) a lo largo de la senda de las células B.

F. Estudios adicionales sobre la retrodiferenciación de los linfocitos B

B-CLL purificadas con FACsVantage (un 95% de células B puras) de pacientes con BCLL fueron tratadas con el anticuerpo CR3/43 en un dispositivo de acuerdo con la presente invención según lo descrito con anterioridad y las células fueron procesadas mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados abajo en la Tabla A confirman también los resultados obtenidos *supra*. Se obtuvo un incremento significativo del número de células CD34⁺ conjuntamente con una gran reducción del número de células con marcadores de la superficie celular característicos del linaje de linfocitos B (CD19, CD20 y CD22). Un punto importante a destacar de la Tabla A es que también muestra un incremento del número de células que son tanto negativas del CD34 como negativas de linaje. Estas células indiferenciadas no están comprometidas con el linaje hematopoyético y preceden en diferenciación a las células madre CD34⁺. Así mismo, el examen de las muestras mediante microscopía óptica demostró una gama de tipos de células adherentes con características morfológicas de las células no hematopoyéticas.

TABLA A

Marcador	0 hr	2 hr	24 hr
CD20	73	67	16
CD14	0	3	23
CD34	0	1	23
CD7	0	2	0
CD16	8	3	2
CD19	95	71	1
CD22	5	3	2
CD33	0	0	0
CD3	0	0	0

La pérdida de los marcadores de superficie celular CD19 mediante la aparición de los marcadores de superficie celular CD34 sobre la misma célula se ha también demostrado y registrado en vídeo en tiempo real utilizando microscopia confocal. Los linfocitos B antes de la adición del mab CR3/43 se tiñeron de verde con un anticuerpo monoclonal conjugado FITC frente al CD19. Después de la adición del mab CR3/43, las células perdieron su fluorescencia verde y empezaron a teñirse de rojo con un anticuerpo monoclonal conjugado PE/Cy5 frente al CD34 pero no de verde (véase la Figura 23, la cual muestra dos imágenes fijas procedentes del vídeo de tiempo continuo). Los resultados claramente confirman que durante la retrodiferenciación de los linfocitos B los marcadores específicos de linaje, como por ejemplo el CD19 se perdieron mientras que un marcador de células madre, como por ejemplo el CD34 se reexpresó.

G. Otros agentes que inducen la retrodiferenciación de linfocitos B en células madre hematopoyéticas

Los estudios iniciales efectivamente identificaron tres agentes-factor de simulación de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), la eritropoyetina y el mAb CD3/43. Una preparación de linfocitos B normales, purificados, enriquecidos, fue tratada en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con uno de estos tres agentes de manera similar a la descrita para el CR3/43 y el TAL.1B5 anteriores y las muestras tratadas fueron examinadas mediante citometría de flujo de acuerdo con lo descrito con anterioridad. En comparación con el control negativo, las tres muestras tratadas con, ya sea el GM-CSF, eritropoyetina, o el mAb CR3/43 mostraron cambios congruentes con la retrodiferenciación. En particular los tres agentes incrementaron el número negativo de células CD34⁺ de la población de células (véase la Figura 20). El mayor efecto sin embargo, se apreció con el CR3/43 y, en consecuencia, este agente fue seleccionado para su uso en los estudios más detallados presentados en la presente memoria.

H. Propiedades de las células madre hematopoyéticas producidas mediante el proceso de retrodiferenciación

Ensayos de constitución de colonias

Para confirmar que las células CD34⁺ observadas mediante citometría de flujo y las células diferenciadas identificadas mediante microscopia presentaban las propiedades de las células hematopoyéticas indiferenciadas, determinadas muestras de sangre tratadas con un anticuerpo frente a la cadena β del HMC de clase II (CR3/43-véase *supra*) fueron sometidas a ensayos de constitución de colonias-procedimiento estándar conocido en la técnica para evaluar las capacidades de las células hematopoyéticas primitivas. Los ensayos de constitución de colonias pueden ser conducidos automáticamente en el dispositivo de acuerdo con la presente invención como parte del mecanismo de rastreo.

Los ensayos clónicos *in vitro* de la célula madre hematopoyética permiten la cuantificación de las células progenitoras primitivas que poseen la capacidad de proliferar, diferenciarse y desarrollarse en células mieloideas y/o eritroideas fenotípica y funcionalmente maduras. Por ejemplo, en presencia de factores de crecimiento la célula madre, una vez implantada/inmovilizada en una matriz de gel suave *in vitro* es capaz de crecimiento clónico (proliferación) y diferenciación.

La Figura 21 es un ensayo de colonia de células madre producidas de acuerdo con los procedimientos de la invención, utilizando el microscopio invertido de campo brillante. En este ensayo las células B obtenidas a partir de una capa leucocítica de donantes de sangre sanos fueron tratadas con el mab CR3/43 y a continuación sometidas a ensayos de colonia de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y procedimientos.

Las pruebas (a) a (e) de la Figura 21 muestran:

- a) La microscopia de campo brillante de un plato de cultivo observado en una ampliación de tres aumentos muestran las colonias eritroidea, mieloidea y mixta (compuesta por células maduras mieloideas y eritroides) las cuales pueden ser apreciadas fácilmente incluso a simple vista. Cada colonia surgió de una célula madre hematopoyética simple mediante proliferación y subsecuente diferenciación.
- b) MIX-CFC esta colonia surgió de una célula madre hematopoyética multipotente simple (células madre capaces de originar células de linajes mieloideo y eritroideo).
- c) M-CFC esta colonia se compone de macrófagos.
- d) GM-CFC esta colonia se compone del linaje meiloideo incluyendo los macrófagos, granulocitos y megacariocitos.
- e) BFU-E esta colonia se compone de células pertenecientes al linaje eritroideo, como por ejemplo normoblastos y glóbulos rojos no nucleados. La coloración roja de las células muestra que están bien hemoglobinizadas. El gran tamaño de esta colonia implica que surgió de una célula madre extremadamente primitiva.

Los mismos resultados se obtuvieron con células con B-CLL (datos no mostrados). Las células B no tratadas no originaron colonias hematopoyéticas (datos no mostrados). Estos resultados, por consiguiente, demuestran la presencia de células madre hematopoyéticas fiables en muestras de sangre tratadas con el anticuerpo monoclonal CR3/43 frente a la cadena β del HMC de clase II pero en muestras de sangre no tratadas.

Cultivo a Largo Plazo

El ensayo a largo plazo examina la potencial autorrenovación de las células madre hematopoyéticas. En este cultivo la mayoría de los componentes de la hematopoyesis de la médula ósea son reproducidos *in vitro*. La característica importante de este cultivo es la hematopoyesis sostenida, la cual se produce, en ausencia de factores de crecimiento añadido. En este ensayo el proceso de hematopoyesis es absolutamente dependiente del establecimiento de una capa adherente de médula ósea derivada de células estromales. Las células estromales (compuestas por una diversidad de células no hematopoyéticas, por ejemplo fibroblastos, adipocitos e incluyendo todo tipo de células pertenecientes al sistema mesenquimatoso) dan soporte a la hematopoyesis mediante la provisión de un entorno apropiado (secreción de factores de crecimiento y síntesis de matriz extracelular) para promover la supervivencia, la autorrenovación, la proliferación y diferenciación de las células madre.

En este ensayo el tratamiento de células B obtenidas a partir de capas leucocíticas de donantes de sangre sanos (los mismos resultados se obtuvieron con células con B-CLL) con el mab CR3/43 originaron la formación de una capa de células adherentes a las horas de añadir el anticuerpo las cuales también se incrementaron a lo largo del tiempo.

La capa adherente se componía de células estromales (células de envuelta, compuestas principalmente por células de tipo fibroblástico/mesenquimatoso/células grandes refractarias a la luz cuando se observan al microscopio invertido de campo brillante (véase la Figura 22) las cuales soportaron el crecimiento y el desarrollo de las células hematopoyéticas hasta 12 semanas y más (estas células muestran un íntimo contacto con las células hematopoyéticas). También visible en la capa adherente se encuentran grupos de células hematopoyéticas primitivas (también conocidas como áreas/racimos de guijarros de células de apariencia oscura) las cuales constituyen el origen de la producción prolongada de células hematopoyéticas.

Las capas no adherentes que están en la parte superior de la capa estromal (racimos de células de apariencia brillante) están compuestas por células redondas pequeñas que constituyen racimos de focos hematopoyéticos. Esta capa contiene células madre y también progenitores más comprometidos del sistema hematopoyético. La capa no adherente fue capaz de originar las colonias MIX-CFC, GM-CFC, M-CFC, BFU-E (tal como se determinó utilizando el ensayo clónico) y CFU-F (colonia que constituye unifibroblastos) (cuando es subcultivada con un medio de cultivo a largo plazo).

I. RT-PCR de células tratadas con un anticuerpo frente a la cadena β del HLA-DR

La transcripción génica fue medida en Ramos (linfoma B) y las células K562 (leucemia eritroidea) tratadas con el mab CR3/43 para el CD34, el c-kit (ligando del factor de células madre), la hemoglobina- ϵ (forma embrionica de hemoglobina) y genes β -actina.

Procedimientos

Un mRNA fue extraído antes y después del tratamiento con el mab CR3/43 utilizando RNAzol (CINA BIOTECH). El mRNA fue sometido a transcripción inversa de cebado de hexámeros mediante la incubación a temperatura ambiente durante 5 mins con un tampón estándar de 4 μ l, 2 μ l de dNTPs, 1 μ l de RNASIN, 1 μ l de cebador

inverso (cebador hexámero aleatorio) y 1 μ l de enzima transcriptasa inversa MMLV. La mezcla fue incubada durante 1 hr a 38°C. Las mezclas fueron entonces sometidas al PCR bajo condiciones estándar utilizando cebadores diseñados para amplificar las frecuencias del CD34, del c-kit, de la hemoglobina- ϵ y de la β -actina. Los cebadores fueron sintetizados en el Randell Institute Kings College de acuerdo con los datos publicados.

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que, mientras que los niveles del ARNm de la β -actina no cambiaron, los niveles del ARNm del CD34, c-kit y de la hemoglobina- ϵ todos aumentaron de modo considerable tras el tratamiento con el mAb CR3/43. Los resultados del CD34 y del c-kit proporcionan un apoyo adicional a los datos detallados en las líneas anteriores que demuestran la retrodiferenciación de los linfocitos B para producir células madre hematopoyéticas.

Los resultados obtenidos para la región de la hemoglobina- ϵ son incluso más interesantes dado que la hemoglobina- ϵ normalmente solo se expresa en células embrionarias. Es, por consiguiente, posible que el tratamiento con el mAb CR3/43 no solo origine células madre hematopoyéticas sino también células indiferenciadas incluso más primitivas, como por ejemplo células madre embrionarias.

J. Sumario

Resumiendo, el dispositivo de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado en la retrodiferenciación de células diferenciadas en células madre. Los ejemplos describen experimentos *in vitro* que revelan hallazgos fecundos, extremadamente interesantes, relativos a la ontogenia y el desarrollo de los linfocitos T y B los cuales pueden ser utilizados en la generación de células madre para llevar a cabo la linfohematopoyesis de las muestras de sangre periféricas en cuestión de horas.

El tratamiento de las muestras de sangre periféricas obtenidas en pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) con recuentos elevados de linfocitos B, con un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β de los antígenos de clase II, dio lugar a un aumento acusado en el número relativo de linfocitos T positivos simples (SP) y de sus progenitores en los cuales fueron positivos dobles para los antígenos CD4 y CD8 de los marcadores timocíticos y estos fueron coexpresados de manera simultánea. Sin embargo, estos fenómenos fueron siempre acompañados por una reducción considerable en el número relativo de linfocitos B. Estas observaciones no fueron apreciadas cuando las mismas muestras de sangre fueron tratadas con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena α de los antígenos de clase II o frente a la región homóloga de los antígenos de clase I.

El tratamiento de la sangre obtenida de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) de células B en un dispositivo de acuerdo con la presente invención con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR pareció originar una linfopoyesis T. Este episodio resultó marcado por la aparición de células positivas dobles que coexpresaban los marcadores CD4 y CD8, la aparición de las células que expresaban CD34 y el incremento concomitante del número de linfocitos simples positivos CD4⁺ CD3⁺ y CD8⁺ CD3⁺. Así mismo, los cambios inmunofenotípicos que tuvieron lugar en la generación de dichas células fueron idénticos a los citados para el desarrollo de los timocitos, especialmente cuando fueron medidos con el paso del tiempo.

Los porcentajes de las células positivas dobles (DP) generadas en un tiempo de incubación de 2 horas de sangre con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR, se redujo con el tiempo y estos episodios vinieron acompañados con el incremento de los porcentajes de las células positivas simples CD4⁺ CD3⁺ y CD8⁺ CD3⁺ de forma simultánea y también en momentos posteriores. Las cadenas α y β del TCR fueron también expresadas en estos tipos de células.

Los linfocitos B fueron constantemente observados perdiendo marcadores tales como los CD19, CD21, CD23, IgM y DR y esto coincidió con la aparición de las células CD34⁺ y CD34⁺ CD2⁺, incrementos en las células CD7⁺, incrementos en las células CD8⁺ CD28⁺ y CD28⁺ incrementos en las células CD25⁺, la aparición de las células CD10⁺ y CD34⁺ y de las células CD34⁺ y CD19⁺, incrementos en las células CD5⁺, y células que expresaban niveles bajos del antígeno CD45. Estos cambios fueron debidos al tratamiento de la sangre con un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR.

Los cambios inmunofenotípicos asociados con dicho tratamiento son congruentes con la retrodiferenciación y el subsecuente compromiso (esto es, el recompromiso) de los linfocitos B porque la mayoría de las células sanguíneas de pacientes con B-CLL antes del tratamiento fueron linfocitos B. Así mismo, los linfocitos B de pacientes con B-CLL que fueron inducidos a convertirse en linfocitos T después del tratamiento con ciclofosfamida y el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR, fueron capaces de retrotraerse a los linfocitos B después de una incubación prolongada con este tratamiento.

Tras el análisis de las muestras tratadas con el anticuerpo monoclonal frente a la cadena β del antígeno HLA-DR, con las pruebas CD16 & 56 y CD3 y CD8 y CD3, el número relativo de células que expresan estos marcadores aumenta constantemente en incrementos coherentes con los determinados con pruebas tales como las CD19 y CD3 y DR y CD3. La investigación del sobrenadante de muestras tratadas y no tratadas de pacientes con la infección VHI utilizando neflometría e inmunoelectroforesis revela el aumento de los niveles de IgG indicativos de que las células B deben haber pasado por la etapa celular de plasma. El incremento del número relativo de las células anteriormente

5 mencionadas vino también acompañado por la aparición de células acusadamente granuladas de medio tamaño que expresaban los antígenos CD56 & 16 en recuentos extremadamente elevados. Otras células que eran extremadamente grandes y acusadamente granuladas fueron observadas fugazmente y fueron positivas para el CD34 y positivas dobles para los marcadores CD4 CD8. Otras células transitorias fueron también observadas y fueron grandes y granulares y positivas para los receptores del CD3 y CD19. El CD25 que estaba presente en la mayoría de los linfocitos B se perdió y resultó expresado mediante linfocitos T nuevamente constituidos cuyo número se observó que aumentaba siempre.

10 Las células CD28⁺ CD8⁺ y CD28⁺ aparecieron después del tratamiento de la sangre de pacientes con B-CLL con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno DR. Estos hallazgos se debieron al tratamiento de la sangre con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR.

15 La linfopoyesis T generada de esta forma se observó también en la sangre periférica de donantes de sangre sanos, en la sangre del cordón umbilical, de la médula ósea, en pacientes con diversas infecciones incluyendo personas con VIH⁺ y pacientes de SIDA, fracciones enriquecidas para los linfocitos B obtenidas de muestras de sangre de donantes de sangre sanos, pacientes con deficiencia de IgA y de otros pacientes con diversos trastornos. Así mismo, el análisis de los marcadores mieloideos en muestras tratadas de dos pacientes con B-CLL con anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena β del antígeno HLA-DR mostraron un aumento significativo en el número relativo de células que expresaban los marcadores mieloideos, como por ejemplo el CD13 y el CD33.

20 Estos marcadores fueron coexpresados con los antígenos CD56 & 16 o el CD7. Sin embargo, el número relativo de células CD7⁺ con marcadores de linfocitos T y sin antígenos mieloideos se observó en una población separada de células. Estas observaciones concretas no fueron observadas en muestras no tratadas o en muestras tratadas con anticuerpos monoclonales frente a los antígenos de clase I o frente a la región homóloga de la cadena α del antígeno HLA-DR (véanse las Gráficas 2 & 3). Estos resultados finales sugieren que los linfocitos B una vez desencadenados por medio de la cadena β del antígeno HLA-DR no son solo capaces de regresar a las células progenitoras de linfocitos T sino que son también capaces de existir en los linajes mieloides y eritroideos.

25 De esta forma, en resumen, lo datos presentados en la presente solicitud demuestran que en un dispositivo de acuerdo con la presente invención (i) es posible convertir las células sanas de un linaje en células que tienen marcadores de la superficie celular y características morfológicas de otros diversos linajes y (ii) es posible obtener células que presenten marcadores de la superficie celular y características morfológicas de células precursoras primitivas (por ejemplo células madre), a partir de linfocitos B y linfocitos T diferenciados.

30 Debe destacarse que se han llevado a cabo una pluralidad de experimentos con las células B-CLL. Las células B-CLL son linfocitos B maduros que son incapaces de diferenciarse en la etapa diferenciada terminal final de una célula plasmática. Por el contrario, debido a un defecto cromosómico, muestran altos niveles de proliferación, por tanto gran número de linfocitos B en la sangre de pacientes con B-CLL. Frente a una pluralidad de células tumorales descritas en la técnica anterior, las células B-CLL no han experimentado ningún tipo de diferenciación inversa limitada, antes de su uso en los procedimientos de la invención. Así mismo no muestran ninguna característica de células indiferenciadas en términos de estructura genómica, marcadores celulares o morfología celular. Son en todos los aspectos linfocitos B maduros.

35 De esta forma, mientras algunas células malignas pueden tener, hasta cierto punto, algunas características de las células indiferenciadas, no es este el caso de las células B-CLL, las cuales constituyen un sistema experimental perfectamente aceptable para estudiar los linfocitos B. De hecho, las células BCLL y Daudi no se distinguen suficientemente de las células normales en cualquier aspecto relevante en estos experimentos. Efectivamente, la pertinencia de las células BCLL como sistema modelico se confirma por Martensson *et al.*, 1989, Eur. J. Immunol 19: 1625-1629) (véase página 1625 rhs. 1^{er}. Párrafo).

40 Así mismo, el tratamiento de muestras de la sangre de capa leucocítica de donantes sanos con el anticuerpo monoclonal CR3/43 se tradujo en una mayor incidencia del CD34 (marcador de célula madre) y una menor incidencia del CD19 (marcador del linfocito B).

45 Debe destacarse que las células madre, que son producidas mediante el procedimiento de la presente invención, pueden ser células madre de cualquier tejido y no están necesariamente limitadas a las células progenitoras linfohematopoyéticas.

Otras modificaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia.

50 Como resultará fácilmente perceptible para los expertos en la materia, el dispositivo de la presente invención no está necesariamente limitado a su uso con una población de células que incluyan células comprometidas y/o un agente de acuerdo con lo divulgado en la presente memoria, y es apropiado para su uso con cualquier procedimiento que requiera la mezcla y la incubación de un fluido con un agente.

55 Aunque la invención ha sido descrita en combinación con formas de realización preferentes específicas, debe entenderse que la invención, tal y como se reivindica, no debe resultar indebidamente limitada a dichas formas de realización específicas. Efectivamente, diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención, los cuales deben resultar evidentes para los expertos en biología molecular o campos relacionados, están destinados a quedar incluidos en el alcance de las reivindicaciones subsiguientes.

TABLA 1

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PACIENTES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MUESTRAS DE SANGRE QUE INCLUYEN RECuentOS COULTER (WBC) DESPUÉS Y ANTES DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE CON DIVERSOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y OTROS AGENTES									
ID PACIENTE	DIAGNÓSTICO	COND. EXP.	WBC/L X 10 ⁻⁹		% LINF		# LINF/L 10 ^X - 9		AGENTE ML / mL
			A	D	A	D	A	D	
1	B-CLL	12 HR a 22 C	100	ND	86,1	ND	86,1	ND	ANTI-B 50
2	B-CLL	2 HR a 22 C	39,1	9,6	74,4	63,3	29,9	6,1	ANTI-B 50
		2 HR a 22 C	39,1	37,7	74,4	75,1	29,9	28,3	ANTI-B PE 50
3	B-CLL	6 HR a 22 C	39,5	9,3	71,9	67,2	28,3	6,2	ANTI-B 50
		6 HR a 22 C	39,5	37,7	71,9	72,5	28,3	27,4	ANTI-B PE 50
4	B-CLL	24 HR a 22 C	39	9,3	73	66,5	28,4	6,2	ANTI-B 50
		24 HR a 22 C	39	36,2	73	70,4	28,4	25,5	ANTI-B PE50
5	B-CLL	2 HR a 22 C							ANTI-B 5
									ANTI-A 50
									ANTI-I 50
									ANTI-B & AGENTE TOXICO 25 + 25
6	B-CLL	24 HR a 22 C							ANTI-B 50
7	B-CLL	24 HR a 22 C	170	128	95,4	91,1	16,9	11,6	ANTI-B 50
				178		94,2		16,8	ANTI-I 10
				130		90,4		11,9	ANTI-B & AGENTE TOXICO 10 + 20
8	B-CLL	24 HR a 22 C	16	7	81,9	51,2	14	3,0	ANI-B 20

(continúa)

9	B-CLL	12 HR a 22 C	+++	89,5 +++ +++ 95,4	87	85,1 85,4 89,4 84,9	+++	76,2 +++ +++	ANTI-B 30 ANTI-I 30 ANTI-4 30 ANTI-I +II +4 10 + 10 + 10
10	B-CLL	2 HR a 22 C	19,3	ND	86	ND	16,7	ND	ANTI-B 30 ANTI-1 30
92	PACIENTE AMBULATORIO	2 HR a 22 C	5,4	ND	74,5	ND		ND	ANTI-B20
87	PACIENTE AMBULATORIO	2 HR a 22 C	4,8	ND	59,3	ND		ND	ANTI-B 20
91	PACIENTE AMBULATORIO	2 HR a 22 C	4,2	ND	54,0	ND		ND	ANTI-B 20
21	PACIENTE AMBULATORIO	2 HR	3,9	ND	47,4	ND		ND	ANTI-B 20
34	PACIENTE AMBULATORIO	2 HR a 22 C	7,2	ND	20,0	ND		ND	ANTI-B
36	LACTANTE CMV	4 HR a 22 C	13,4	ND	7,3	ND		ND	ANTI-B 20
93	LACTANTE VIH ⁺	4 HR a 22 C	5,6	ND	43,4	ND		ND	ANTI-B 20
BB / ST	BEBE 6 DIAS 40% BLASTOCITOS EN SANGRE	2 HR a 22 C 24 HR a 22 C	60,5	ND	20,2	ND	12,2	ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25

VIH 25	SIDA	2HR AT 22C	7,5	ND	34,8	ND	2,6	ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25 + 25
43/BD	DEFICIENTE CÉLULA B	4HR AT 22C							ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20
OB/BD	DEFICIENTE CÉLULA B	4HR AT 22C							ANTI-6 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20
ID PACIENTE	DIAGNÓSTICO	COND. EXP	WBC/L X10 - 9	% LINF	# LINF 10X -9	AGENTE ML / mL			
			A	D	A	D			
VIH ⁺	SIDA	6HR AT 22C							ANTI-B 20 ANTI-I
IgA - D	Deficiente IgA	6HR AT 22C							ANTI-B 20 ANTI-I 20
COND. EXP.: CONDICIONES EXPERIMENTALES									
A: ANTES									
D: DESPUÉS									
ANTI - B: anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga β del antígeno HLA-DR									
ANTI - A: anticuerpo monoclonal de la región homóloga de la cadena α del antígeno HLA-DR									
ANTI-I: anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de los antígenos de Clase I									
ANTI-AB: ambos ANTI-B y ANTI-A sumados conjuntamente									
ANTI4: anticuerpo monoclonal frente al antígeno CD4									
ANTI-I + II + 4: ANTI-I y ANTI-B y ANTI-4 sumados conjuntamente									
Agente Citóxico: Ciclofosfamida									
ML/ml: microlitro por ml									
L: litro									

TABLA 2

**INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS
DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A
LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA BETA DEL HLA-DR CON LOS ANTICUERPOS
MONOCLONALES CD19 Y CD3**

PACIENTE	% CD19+		% CD3+		% CD19+CD3+		% CD3-CD19-		% CD19+HG CD3-FC+	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1	88	40	5	19	1	2	6	26	0	12
2	73	15	10	33	2	7	15	41	0	5
3	73	11	11	33	2	2	14	52	0	2
4	71	13	11	37	2	2	16	47	0	2
5	85	40	5	16	1	1	6	26	3	18
6	85	43	5	18	0	1	6	27	3	10
7	90	72	2	4	0	2	7	8	0	14
8	60	25	7	13	0	1	29	55	2	6
9	90	85	2	3	0	0	2	1	1	4
10	78	50	7	14	0	0	14	26	0	8
92	12	10	38	49	0	1	49	40	0	0
91	7	3	35	29	0	1	59	67	0	0
87	5	3	32	38	1	1	63	58	0	0
21	1	1	27	29	1	0	71	70	0	0
34	1	1	13	13	0	2	86	84	0	0
39	10	6	23	25	0	0	67	69	0	0
93	6	3	26	27	1	1	68	70	0	0
BB/ST	1	1	12	13	0	0	87	86	0	0
VIH25	7	2	26	27	0	0	68	67	0	0
43/BD	0	0	40	42	0	1	58	54	0	0
04/BD	0	0	49	41	0	3	43	41	0	0
VIH+	1	1	10	14	0	0	89	87	0	0
IgA/D	10	1	21	25	2	3	67	71	0	0
A: antes del tratamiento D: después del tratamiento										

ES 2 330 190 T3

TABLA 3

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA CADENA B DE LA REGIÓN HOMÓLOGA DEL HLA-DR CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD4 Y CD8										
PACIENTE	% CD8+		% CD4+		% CD4+CD8+		% CD4-CD8-		% CD4+ BAJO	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1	2,8	16	2,9	11,4	0	3,2	93,1	67,6	0	0
2	6,2	13,2	9,1	24,3	0	9,4	78,7	46	5,8	6,3
3	7,2	13,1	7,4	23,9	0	8,2	78,8	48,1	6,3	6,6
4	10,1	24,2	7,6	24,9	0,3	2,8	77,5	42	4,6	5
5	2,9	16,2	1,8	7,6	0	2	95	62,3	0	0
6	ND	12	ND	8,1	ND	1,7	ND	75,7	ND	0
7	1,9	2,6	1,9	2,8	0	0	95,8	94,3	0	0
8	3,2	7	3,9	6,9	0,1	2	87,3	79,8	4,3	0
9	2,8	2,9	3	3	0	0	94	94,1	0	0
10	5,7	9,4	4,7	9,1	0,6	0,8	88,7	79,2	0	0
92	21	19	21,6	21	0,8	1,9	50,5	52,5	5,3	4,8
91	15,4	18,1	13,6	17,9	6,2	2,6	57	57,3	7,3	3,5
87	16,8	21,8	13,4	20,4	2,9	2,6	59,5	48,9	7	5,6
21	16	24,1	9,1	15,2	1	2,6	69,6	53,2	3,7	4,2
34	9,4	11,9	5,7	4,9	2	3,3	67,6	65,3	14,4	14,5
39	12,1	12,6	13,1	14,6	0,4	1,3	62,3	66,7	11,9	4,3
93	18,9	20,3	9,7	10,3	1,8	1,4	65,5	65,9	3,4	1,8
BB/ST	6,3	13	5,7	7,3	2,2	1,1	34,7	70,3	50,3	7,6
VIH25	24,1	24,9	0,8	1,1	1,3	5	70,2	69,3	2,9	3,8

ES 2 330 190 T3

TABLA 4

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD3 Y DR										
PACIENTE	DR+		CD+		CD+ DR+		DR- CD3-		DR+ HCD3-	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1	87	45,5	3,5	20,8	2,5	4,2	6,9	21,6	0	7,6
2	76,2	19,4	9,5	29,2	3,9	8,7	10,3	36,8	0	5,5
3	77,7	18,3	8,4	29,4	4,1	8,8	9,6	38,1	0	4,7
4	76,8	19,2	7,6	29,5	6,2	10,5	9,1	37,2	0	3,3
5	ND	47,1	ND	11,5	ND	9,9	ND	22,4	ND	7,3
6	ND									
7	91,4	85,8	2,4	2,5	0,7	0,7	5,1	4,2	0	6,3
8	61,8	28,9	6,5	11,2	2	3,3	28,6	54,6	0	1,5
9	ND									
10	82,6	44,7	4,3	9,8	3,3	5	9,8	22,2	0	17,9
92	23,8	14,1	39,3	41,9	4,5	3,5	32,4	40,5	0	0
91	13,3	7,9	29,6	32,5	3,4	2,9	53,4	56,5	0	0
87	14,8	12,2	28,4	34,1	5,5	6,6	51,1	46,5	0	0
21	ND									
34	11,9	12,9	10,4	13,7	0,8	0,6	76,7	72,8	0	0
39	25,6	13,7	24,6	25,2	3	2,8	46,5	25,2	0	0
93	13,3	8,9	18,4	18,9	9,9	10,1	58,2	61,7	0	0
BB/ST	44,2	32,5	11,7	12,2	0,8	0,8	43	49,4	0	4,6

ES 2 330 190 T3

TABLA 5

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD16+ 56 CD3+								
PACIENTES	CD56+ &16		CD3+		CD56+ &16+ CD3+		CD56+ &16- CD3-	
	A	D	A	D	A	D	A	D
1	2	4,3	5,7	19,7	0,7	1,7	91,3	73
2	11,5	38,9	12,4	32,6	1	6,6	74,5	21
3	12	36,2	12,1	34,5	0,7	6	75,5	23
4	12,2	32,6	12,4	39,6	05	5	74,7	22,2
5	ND	13,1	ND	9,4	ND	2,6	ND	73,5
6	ND							
7	0,8	0,8	2,8	2,4	0,3	0,2	96,2	96,3
8	24,8	52	5,4	12,4	0,9	4,1	68,3	31,1
9	ND							
10	1,1	1,3	6,1	13,7	2,1	2,5	90,5	82,4
92	23,8	34,5	44,3	44,8	2	1,5	29,2	18,6
91	4,6	53,9	28,8	29,4	3	3,2	63,3	63,3
87	47,9	46,4	28,8	36,5	5,8	3,7	16,9	13
21	9,4	9,4	19,7	23,6	4,2	6,7	66	59,5
34	21,5	12,8	11,4	13,7	1,8	0,6	64,6	72,8
39	7	2,7	23,4	26,1	1,1	0,1	68,2	71
93	55,8	54,9	26,2	26,3	1,7	2	16,1	16,8
BB/ST	28,8	29,9	12	14,3	0,8	0,8	49,4	53,6

ES 2 330 190 T3

TABLA 6

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD45 Y CD14						
PACIENTES	CD45+ H		CD45+ L		CD45+ CD14+	
	A	D	A	D	A	D
1	90,5	70,1	7,5	21,9	0,8	3,3
2	85,8	52,2	8,8	38,3	5,3	9,5
3	84,3	52,2	9,9	33,8	5,1	13,2
4	91,5	79,2	2,1	7	5,7	10,8
5	63,1	84,6	34,9	9,4	0,5	3,6
6	ND					
7	52,8	85,2	45,6	13,9	0,5	0,6
8	71,1	55	71,1	34,5	5,3	8,7
9	SEE					
10	79,7	47,3	16,3	48	2,1	1,9
92	61,7	64,7	27,4	26,6	5,9	3,6
91	49,4	49,2	40,4	44,3	6,5	3,2
87	52,4	61,5	36,1	28,7	7	6,5
21	45,8	43,3	44,3	47,6	6,2	3,3
34	24,4	24,6	54,8	59,6	13,3	9,7
39	48,7	46,3	30,5	42,1	14,5	8,8
93	SEE					
VIH+	22,6	26,9	66,8	63,5	6,8	6,7
IgA/D	47,4	59,8	41,9	33,3	5,9	4,1

ES 2 330 190 T3

TABLA 7

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL Y OTROS TRASTORNOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD8 Y CD3								
PACIENTES	CD8+		CD3+		CD8+ CD3+		CD8- CD3-	
	A	D	A	D	A	D	A	D
2	0,6	1,3	7,5	19,3	4,2	19,3	87,7	63,8
3	1,1	1,4	8,3	20,3	5,6	18,4	84,8	59,8
4	3,5	2,9	8,3	27	3,9	16,6	84,2	53,1
92	3,5	1,9	27,6	25,2	18,4	19	50,3	52,8
91	4	3,1	18,2	19	14,1	12,6	63,6	65,3
87	5,7	3,9	19,9	23,6	15,4	17,4	58,8	55
21	4,8	7,4	16,3	17,3	13,7	13	65,2	62
34	3	3,6	5,2	6,7	7,6	7,5	84,1	82,3

TABLA 8

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD45 Y CD14			
TIEMPO	DR+ CD45+ CD14+ r	CD45+ L	CD45+ H
2 HR	81,7	8,2	8,2
6 HR	80,7	8,1	10,6
24 HR	79	1,1	18,4

TABLA 9

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD19 Y CD3				
TIEMPO	CD19+ DR+ r	CD3+	CD3+ DR+	CD19- CD3- DR-
2 HR	87,4	10,1	1,8	10,7
6 HR	75,5	10,4	3,1	10,7
24 HR	74	11,7	2,9	11

ES 2 330 190 T3

TABLA 10

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD4 Y CD8					
TIEMPO	CD8+ & DR+ r	CD4+	CD4+ & CD8+ & DR+ r	CD4+ DR+	CD4- CD8- DR-
2 HR	77,6	6,8	5,4	1,3	8,8
6 HR	75,8	6,7	6,4	1,8	9,3
24 HR	77	6,4	4,8	1,9	11

TABLA 11

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD3 Y DR				
TIEMPO	DR+	CD3+	CD3+ DR+	CD3+ DR-
2 HR	75	9,5	4,2	10,9
6 HR	74,8	8,8	4,8	10,9
24 HR	ND	ND	ND	ND

TABLA 12

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD16 & 56 Y CD3				
TIEMPO	CD56+ & 16+ DR+ r	CD3+	CD56+ CD16+ & CD3+ DR+ r	CD56- CD16- & CD16- DR-
2 HR	82,5	9,5	4,1	3,5
6 HR	84,3	7,5	4,1	3,3
24 HR	ND	D	ND	ND

TABLA 13

INMUNOFENOTIPIA DE UN PACIENTE CON B-CLL CON EL PASO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO PE FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS CD8 Y CD3				
TIEMPO	CD8+ DR+	CD3+	I CD8+ CD+ 3&DR+ r	CD8- CD3- DR-
2 HR	76,2	6,6	6,7	10,6
6 HR	76,5	6,2	6,2	10,3

TABLA 14

INMUNOFENOTIPIA DE PACIENTES CON B-CLL ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE SANGRE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA A DEL HLA-DR, LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR, LAS DOS MONOCLONALES CONJUNTAMENTE, MONOCLONALES FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B MÁS CICLOFOSFOAMIDA Y LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I MEDIDA CON EL PASO DEL TIEMPO																					
		CD19+					CD3+					CD19+ CD3+					CD19- CD3-				
ID		A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1
5/6																					
2H	86	91	54	40	89	5	4	16	23	5	1	1	3	2	1	1	6	4	27	33	5
24	N	88	51	60	86	N	4	18	10	4	N	2	1	2	3	N	4	29	28	7	
10																					
2H	77	N	59	N	80	7	N	13	N	7	1	N	1	N	0	14	N	26	N	12	
09																					
24	8	N	N	N	6	32	N	N	N	38	1	N	N	N	1	59	N	N	N	56	
43/BD																					
6H	0	N	0	0	0	40	N	42	43	49	0	N	1	0	1	58	N	54	54	47	
04/BD																					
6H	0	N	0	0	0	49	N	41	45	46	0	N	3	1	3	43	N	42	44	41	
VH1+																					
6H	1	N	0	N	1	10	N	14	N	12	0	N	0	N	0	89	N	86	N	87	
IgA/d																					
6H	10	N	1	N	12	21	N	25	N	20	2	N	1	N	3	67	N	71	N	68	
A: Antes; D: Después; DA: Después de la adición del anticuerpo frente a la cadena β; DAC: después de la adición del anticuerpo tanto frente a la cadena alfa como a la cadena beta y ciclofosfoamida; D1: después de la adición del anticuerpo frente a la Clase I																					

TALBA 15

CD8 Y CD4																								
		CD8+					CD4+					CD4+ CD8+					CD4- CD8-							
ID		A	DD	DA	DAC	D1	D1	A	DD	DA	DAC	D1	D1	A	DD	DA	DAC	D1	D1	A	DD	DA	DAC	D1
5/6																								
2H		3	2	14	10	4		2	2	8	8	3		0	0	3	2	1		95	94	74	79	93
24		N	3	9	4	4		N	3	8	4	3		N	0	2	2	0		N	94	81	90	93
10																								
2H		3	N	7	N	4		4	N	7	N	3		1	N	2	N	1		91	N	83	N	92
09																								
24		10	N	N	N	15		21	N	N	N	38		2	N	N	N	2		61	N	N	N	53

TABLA 16

CD3 Y DR																				
DR+					CD3+					CD3+ DR+					CD3- DR-					
	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1
ID																				
5/6																				
2H	N	90	54	N	87	N	4	12	N	4	N	2	10	N	3	N	5	22	N	5
10																				
2H	83	N	63	N	81	4	N	8	N	4	4	N	7	N	4	9	N	23	N	12
09																				
24	14	N	N	N	13	30	N	N	N	36	3	N	N	N	3	51	N	N	N	47

TABLA 17

CD16 & 56 Y CD3																								
	CD56 + & 16+						CD3+						CD56+ & 16+ CD3+						CD56- & 16- CD3-					
	A	DD	DA	DAC	D1		A	DD	DA	DAC	D1		A	DD	DA	DAC	D1		A	DD	DA	DAC	D1	
ID																								
5/6																								
2H	N	0	13	N	4		N	5	9	N	5		N	1	3	N	1		N	94	74	N	90	
10																								
2H	0	N	1	N	1		6	N	14	N	6		1	N	2	N	1		92	N	65	N	92	
09																								
24	42	N	N	N	41		36	N	N	N	38		2	N	N	N	2		20	N	N	N	19	

TABLA 18

CD45 Y CD14															
ID	CD45+ L					CD45+M					CD45+ H				
	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1
5/6	0	0	5	10	0	44	43	50	50	32	55	43	50	31	67
2H	0	0	0	0	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62
10	0	N	0	N	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62
2H	0	N	0	N	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62
09	2	N	N	N	1	18	N	N	N	16	71	N	N	N	76
24	4	N	3	N	6	63	N	61	N	41	23	N	27	N	40
VIH+	4	N	3	N	6	63	N	61	N	41	23	N	27	N	40
6H	4	N	3	N	6	63	N	61	N	41	23	N	27	N	40
IgA / D	2	N	2	N	4	40	N	31	N	44	47	N	60	N	44
6H	2	N	2	N	4	40	N	31	N	44	47	N	60	N	44

TABLA19

CD8 Y CD28																				
	CD8+					CD28+					CD8+ CD28+					CD8- CD28-				
ID	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1
5/6																				
2H	N	3	6	N	3	N	1	4	N	2	N	1	4	N	1	N	95	86	N	94
8																				
2H	4	N	6	N	N	3	N	5	N	N	1	N	3	N	N	92	N	86	N	N

TABLA 20

CD34 Y CD2																									
CD34+						CD2+						CD34+ CD2+						CD34- CD2-							
A DD DA DAC D1						A DD DA DAC D1						A DD DA DAC D1						A DD DA DAC D1							
ID						A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1	A	DD	DA	DAC	D1
5/6																									
2H						N	1	34	N	N	N	6	13	N	N	N	3	30	N	N	N	90	21	N	N
24						N	1	6	9	N	N	7	23	4	N	N	3	33	43	N	N	87	34	34	N
VIH+																									
2H						2	1	12	13	N	20	21	21	12	N	4	5	9	14	N	73	73	64	60	N
BB/ ST																									
2H						26	23	33	14	N	15	14	15	15	N	31	30	23	36	N	27	32	28	35	N
24						N	11	29	11	N	N	13	12	9	N	N	27	9	18	N	N	48	49	61	N

ES 2 330 190 T3

TABLA 21

análisis FACs que utiliza células derivadas de capa leucocítica humana							
		2h Análisis	2h Análisis	24h Análisis	24h Análisis	5d Análisis	5d Análisis
Marcador CD	Análisis Inicial	Células no tratadas	Células tratadas	Células no tratadas	Células tratadas	Células no tratadas	Células tratadas
CD45							
CD38	54,8	55,6	30,1	51,8	52,8	13,0	5,4
CD34	0,6	0,5	11,5	9,7	8,0	0,4	25,1
CD10	0,2	0,0	0,9	1,9	1,8	0,0	0,2
CD19	13,2	0,0	15,1	11,1	2,3	8,7	0,7
CD34	1,8	13,1	0,4	13,0	9,1	0,4	25,8
CD3	56,3	62,6	29,7	46,9	69,2	79,8	63,4
CD117	0,3	0,6	0,9	1,3	0,8	0,2	0,1
CD34	1,8	0,6	7,4	6,4	6,0	0,2	24,6
CD71	1,5	0,4	0,0	4,8	3,9	0,2	42,9
GL Y CA	5,4	2,3	10,1	3,6	2,8	3,8	1,8
CD34	1,3	0,6	14,3	12,5	8,9	0,4	24,3
CD90	18,4	12,6	0,9	9,3	5,0	0,1	0,3
AC133	0,1	0,0	2,0	0,3	0,4	0,0	0,1
CD34	1,5	0,6	11,9	10,8	7,7	0,0	13,2
Los valores son expresados como el porcentaje de células que expresan marcadores							

ES 2 330 190 T3

Gráfica 1

CAMBIOS INMUNOFENOTÍPICOS DE MUESTRA DE SANGRE NO TRATADA Y TRATADA DE PACIENTE (2, 3, & 4) CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA β DEL ANTÍGENO HLA-DR MEDIDOS CON EL PASO DEL TIEMPO.

	SIN	CON	FL1	FL2	TIEMPO
5	NADA001	CON002	CD45	CD14	2 HR
	NO001	WE002	CD45	CD14	6 HR
10	001001	002002	CD45	CD14	24 HR
	NADA003	CON004	CD3	CD19	2 HR
	NO003	WE004	CD3	CD19	6 HR
15	001003	002004	CD3	CD19	24 HR
	NADA004	SIN005	CD4	CD8	2 HR
	NO004	WE005	CD4	CD8	6 HR
20	001004	002005	CD4	CD8	24 HR
	NADA005	SIN006	CD3	DR	2 HR
	NO005	WE006	CD3	DR	6 HR
25	001005	002006	CD3	DR	24 HR
	NADA006	CON007	CD3	CD56 & 16	2 HR
	NO006	WE007	CD3	CD56 & 16	6 HR
30	001006	002007	CD3	CD56 & 16	24 HR
	N003	W004	CD3	CD8	2 HR
	NO007	WE008	CD3	CD8	6 HR
35	001007	002008	CD3	CD8	24 HR

ES 2 330 190 T3

Gráfica 1A

CAMBIOS INMUNOFENOTÍPICOS DE MUESTRA DE SANGRE NO TRATADA Y TRATADA DE PACIENTE (2, 3, 4) CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA β DEL ANTÍGENO HLA-DR CONJUGADO CON PE MEDIDOS CON EL PASO DEL TIEMPO.

ID	FL1	FL2	TIEMPO
WL003	CD45	CD14	2 HR
WEL003	CD45	CD14	6 HR
003003	CD45	CD14	24 HR
WL005	CD3	CD19	2 HR
WEL005	CD3	CD19	6 HR
003005	CD3	CD19	24 HR
WL006	CD4	CD8	2 HR
WEL006	CD4	CD8	6 HR
003006	CD4	CD8	24 HR
WL007	CD3	DR	2 HR
WEL007	CD3	DR	6 HR
WL008	CD3	CD56 & 16	2 HR
WEL008	CD3	CD56 & 16	6 HR
WL005	CD3	CD8	2 HR
WEL009	CD3	CD8	6 HR

ES 2 330 190 T3

Gráfica 2

**CAMBIOS INMUNOFENOTÍPICOS DE SANGRE NO TRATADA Y TRATADA DE PACIENTE (1)
CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA β
DEL ANTÍGENO HLA-DR, ESTE ANTICUERPO Y LA CICLOFOSFAMIDA, EL ANTICUERPO
MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA α DEL ANTÍGENO HLA-
DR Y EL ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DEL ANTÍGENO
DE CLASE I MEDIDOS CON EL PASO DEL TIEMPO.**

	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
		NA001	CD45	CD14	2 HR
	A2B001:AB		CD45	CD14	2 HR
	A2A: AA		CD45	CD14	2 HR
	DNAA001: ABC		CD45	CD14	2 HR
	A1001: AI		CD45	CD14	2 HR
		NC001	CD3	CD19	2 HR
	C2B001:AB		CD3	CD19	2 HR
	C2A001: AA		CD3	CD19	2 HR
	DNAC001: ABC		CD3	CD19	2 HR
	C1001: AI		CD3	CD19	2 HR
	A124H001: AI		CD3	CD19	24 HR
	A2824H001: AB		CD3	CD19	24 HR
	A2424H001: AA		CD3	CD19	24 HR
	A28X24H001: ABC		CD3	CD19	24 HR
		ND001	CD4	CD8	2 HR
	D2B001: AB		CD4	CD8	2 HR
	D2A001: AA		CD4	CD8	2 HR
	DNAD001: ABC		CD4	CD8	2 HR
	D1001: AI		CD4	CD8	2 HR
	D124H001: AI		CD4	CD8	24 HR
	D2BX24H001: ABC		CD4	CD8	24 HR
	D2B001: AB		CD4	CD8	24 HR
	D2A001: AA		CD4	CD8	24 HR
	E1001: AI		CD3	DR	2 HR
	E2B001: AB		CD3	DR	2 HR
	E2A001: AA		CD3	DR	2 HR
	F1001: AI		CD3	CD56 & 16	2 HR
	F2B001: AB		CD3	CD56 & 16	2 HR
	F2A001: AA		CD3	CD56 & 16	2 HR
	G1001: AI		CD28	CD8	2 HR
	G2A001: AA		CD28	CD8	2 HR
	G2B001: AB		CD28	CD8	2 HR
	H1001: AI		CD7	CD33 & 13	2 HR

ES 2 330 190 T3

	H2A001: AA		CD7	CD33 & 13	2 HR
	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
	H2B001: AB		CD7	CD33/13	2 HR
5	12A001: AA		CD21	CD5	2 HR
	12B001: AB		CD21	CD5	2 HR
	J2A001: AA		CD34	CD2	2 HR
10	J2B001: AB		CD34	CD2	2 HR
	B2A24H001: AA		CD34	CD2	24 HR
	B2B24H001: AB		CD34	CD2	24 HR
	B2BX24H001: ABC		CD34	CD2	24 HR
15	K2B001: AB		CD10	CD25	2 HR
	K2A001: AA		CD10	CD25	2 HR

20

Gráfica 3

25 **CAMBIOS INMUNOFENOTÍPICOS DE SANGRE NO TRATADA Y TRATADA DE PACIENTE (8) CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA β DEL ANTÍGENO HLA-DR**

	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
		AN001	CD45	CD14	2 HR
30	A2001		CD45	CD14	2 HR
		CN001	CD3	CD19	2 HR
	C2001		CD3	CD19	2 HR
35		DN001	CD4	CD8	2 HR
	D2001		CD4	CD8	2HR
		EN001	CD3	DR	2 HR
40	E2001		CD3	DR	2 HR
		FN001	CD3	CD56 & 16	2 HR
	F2001		CD3	CD56 & 16	2 HR
45		GN001	CD28	CD8	2 HR
	G2001		CD28	CD8	2 HR
		HN001	CD7	CD5	2 HR
50	H2001		CD7	CD5	2 HR
		IN001	CD13	CD20	2 HR
	I2001		CD13	CD20	2 HR
55		JN001	CD45RA	CD25	2 HR
	J2001		CD45RA	CD25	2 HR
		KN001	CD57	CD23	2 HR
60	K2001		CD57	CD23	2 HR

65

ES 2 330 190 T3

Gráfica 4

CAMBIOS INMUNOFENOTÍPICOS DE MUESTRA DE SANGRE NO TRATADA Y TRATADA DE PACIENTE (10) CON ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA β DEL ANTÍGENO HLA-DR Y EL ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I

SIN	CON	FL1	FL2	TIEMPO
	CLL0001	CD45	CD14	2 HR
CLL1001		CD45	CD14	2 HR
CLL2001		CD45	CD14	2 HR
	CLL0003	CD3	CD19	2H
		CD3	CD19	CD3
CLL1003		CD3	CD19	CD3
CLL2003		CD3	CD19	CD3
	CLL0004	CD4	CD8	2 HR
CLL1004		CD4	CD8	2 HR
CLL2004		CD4	CD8	2 HR
	CLL005	CD3	DR	2 HR
CLL1005		CD3	DR	2 HR
CLL2005		CD3	DR	2 HR
	CLL0006	CD3	CD56 & 16	2 HR
CLL1006		CD3	CD56 & 16	2 HR
CLL2006		CD3	CD56 & 16	2 HR

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para constituir y/o incrementar el número relativo de células indiferenciadas de una población de células que incluye células comprometidas, dispositivo que comprende una cámara, un medio de introducción dentro de dicha cámara de una población de células que incluye células comprometidas, un medio de introducción en dicha cámara de un agente que provoca que la célula comprometida se retrodiferencie dando una célula indiferenciada, un medio de incubación para incubar dicho agente y dichas células comprometidas de tal manera que la célula comprometida se retrodiferencie dando una célula indiferenciada, un medio de pesada para determinar el peso de la población de células de entrada, y un medio para calcular el volumen de dicha población de células en base al peso determinado, un medio para llevar a cabo los recuentos de células y para medir la concentración de células de dicha población de células y un medio de cálculo para calcular el volumen del agente que va a ser añadido a la cámara, dependiendo el volumen del agente tanto del volumen como de la concentración de las células de la población de células.
2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende un medio de transferencia para transferir una cantidad de dicha población de células desde un recipiente de almacenaje hasta dicha cámara.
3. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho dispositivo comprende un medio de control de la temperatura para controlar la temperatura de dicha cámara.
4. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de control de dióxido de carbono para controlar la concentración del dióxido de carbono de dicha cámara.
5. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de retirada para retirar una muestra de células, que comprende células indiferenciadas, desde la cámara hasta el interior del recipiente de almacenaje.
6. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de sellado para sellar un recipiente de almacenaje que comprende una población de células que comprende células indiferenciadas.
7. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de temporización para medir el tiempo del periodo de incubación y/o un medio de representación para representar al usuario el periodo de tiempo que resta del periodo de incubación y/o un medio de alarma para alertar al usuario de la culminación del periodo de incubación.
8. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de transferencia adicional para transferir un volumen del agente hasta la cámara.
9. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicho medio de transferencia adicional es una jeringa accionada por un motor.
10. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de mezcla para mezclar la población de células y el agente dentro de la cámara.
11. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo comprende un medio de recogida para recoger células de la cámara.
12. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho dispositivo es capaz de una comunicación a distancia.
13. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que uno o más componentes del dispositivo es desechable.
14. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13 en el que los componentes desechables son suministrados en forma de cartucho para su inserción dentro del dispositivo.

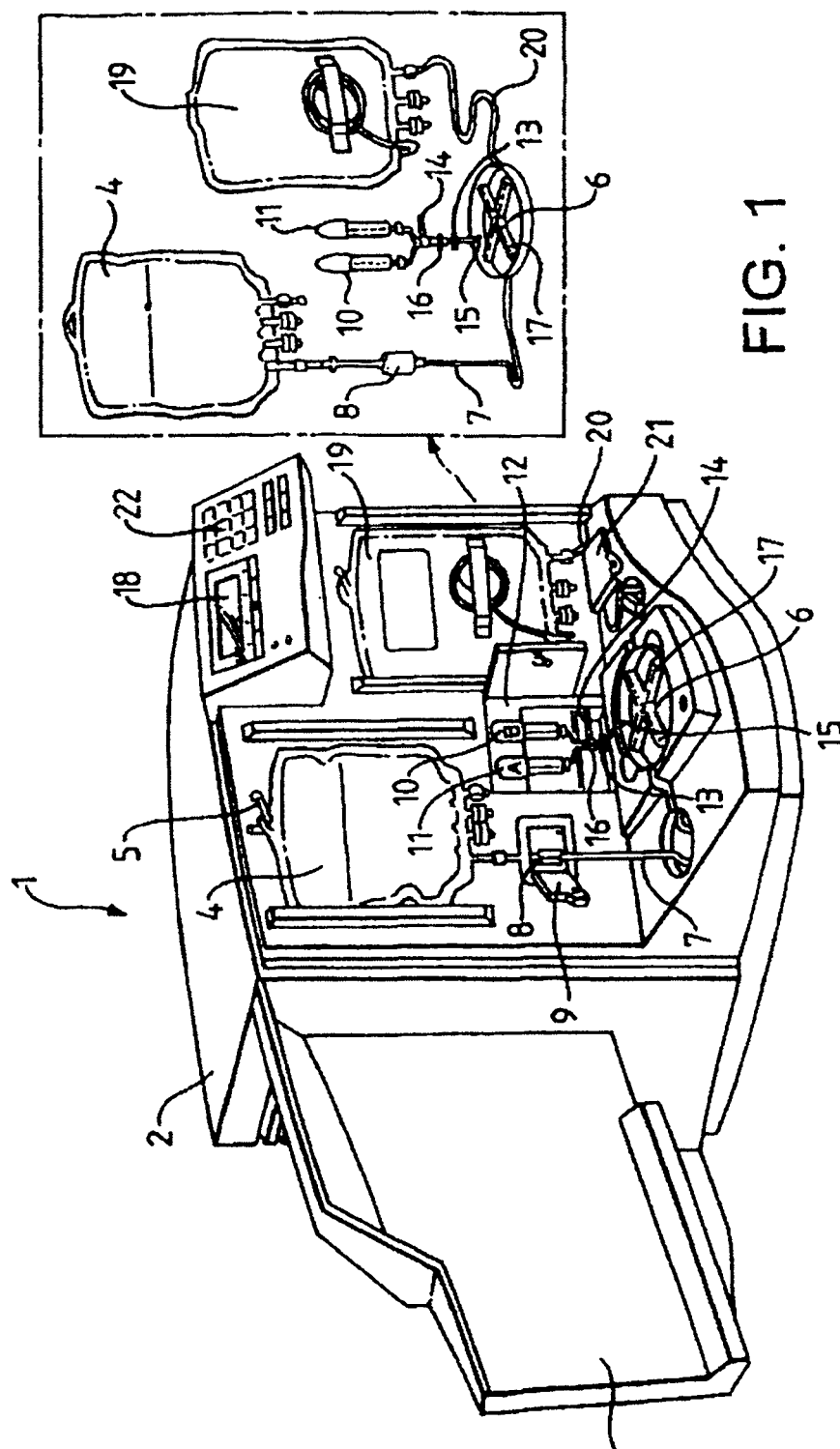


Fig. 1

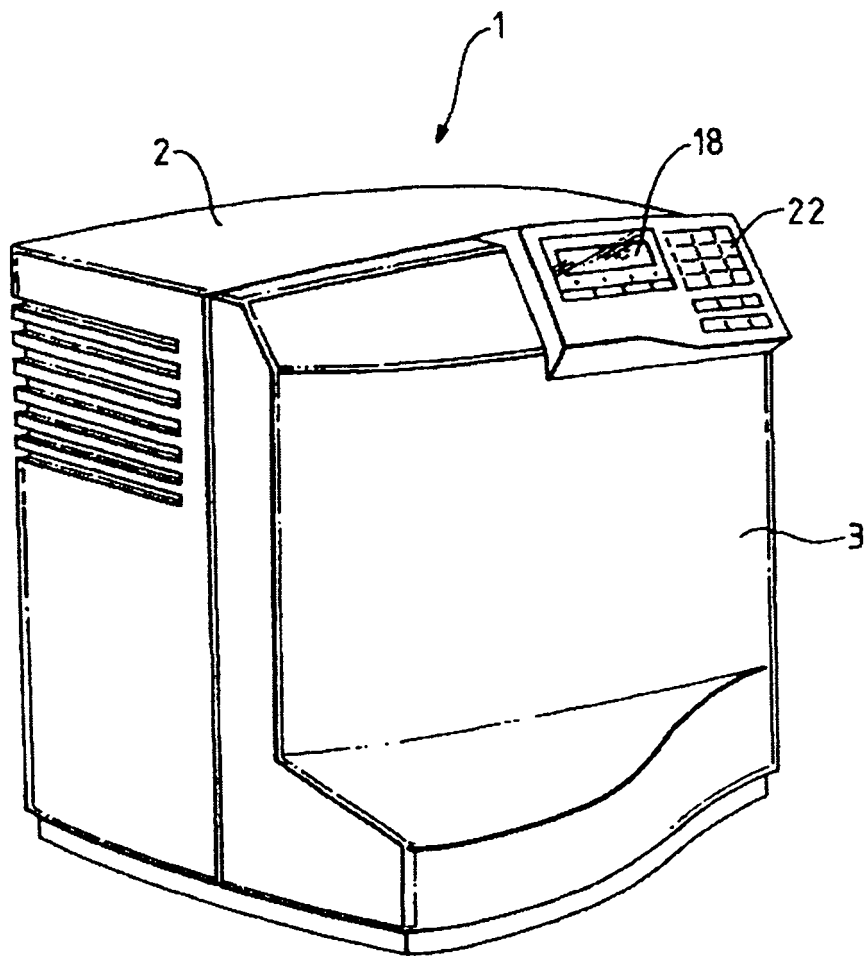


FIG. 2

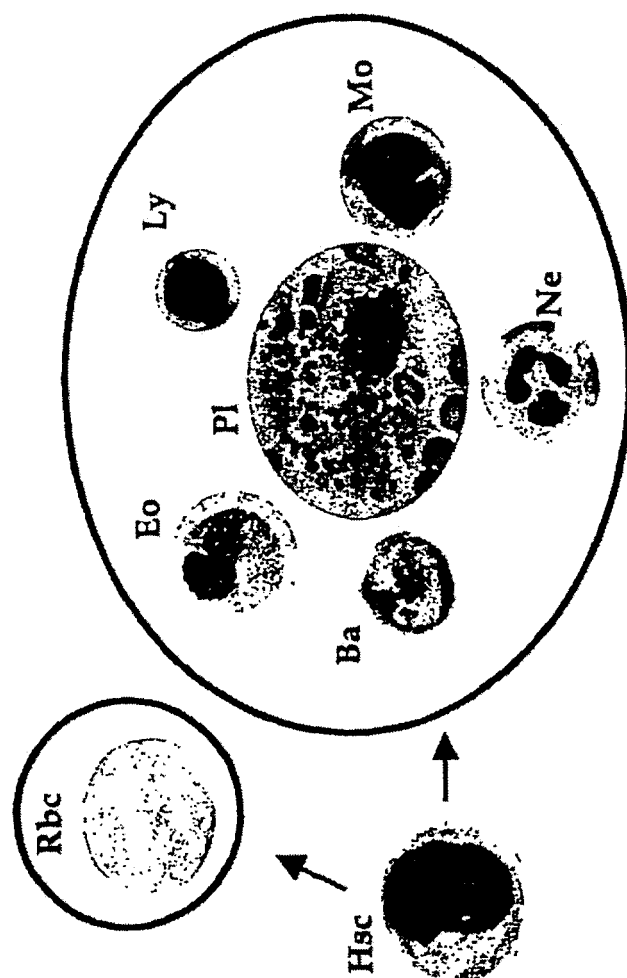
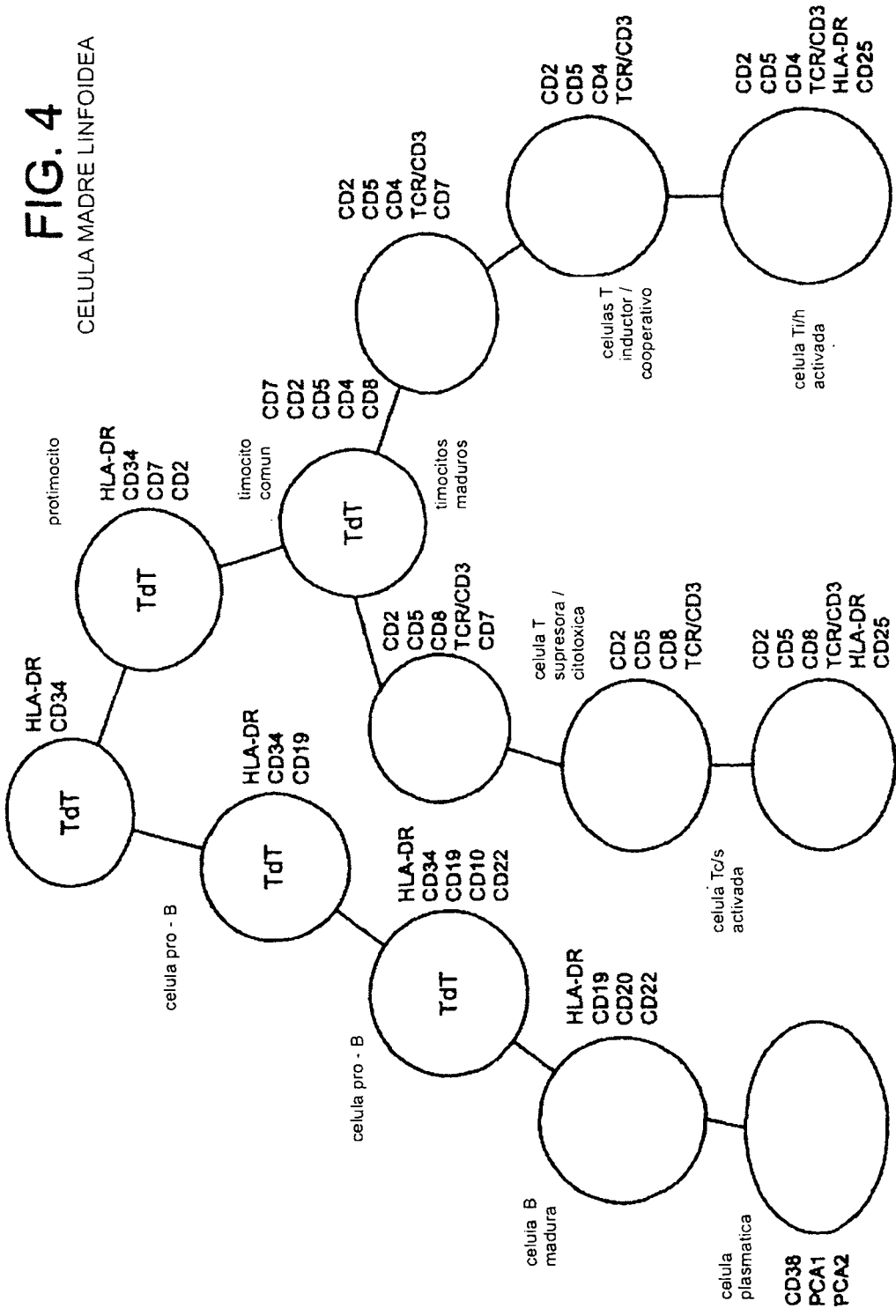


FIG. 3



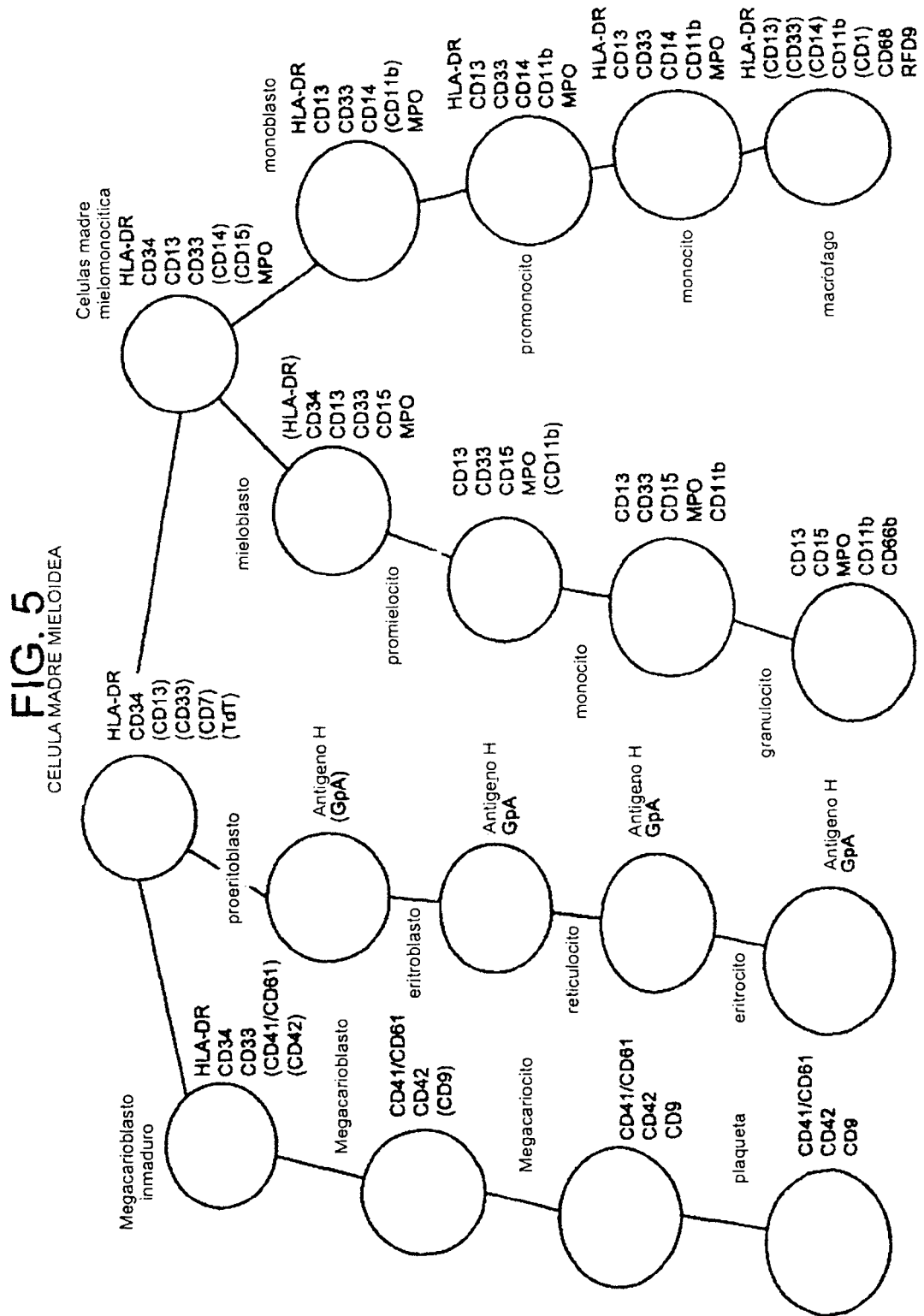
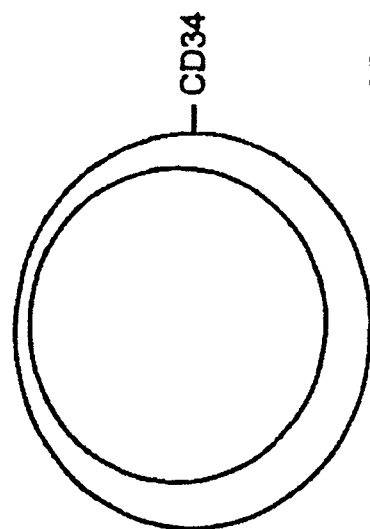


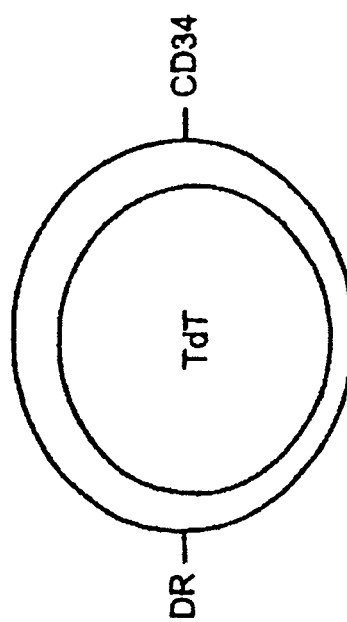
FIG. 6

LAS CELULAS PROGENITORAS LINFOMATOPOYETICAS

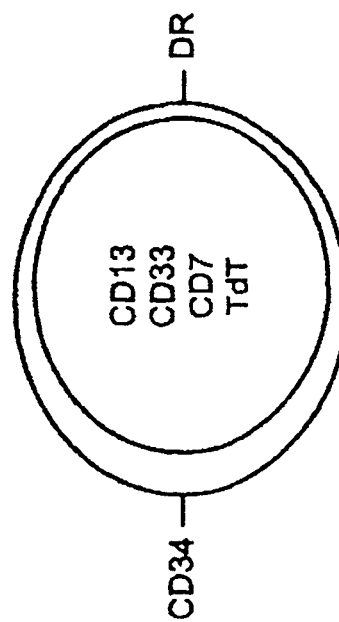
CELULAS MADRE PLURIPOTENTE

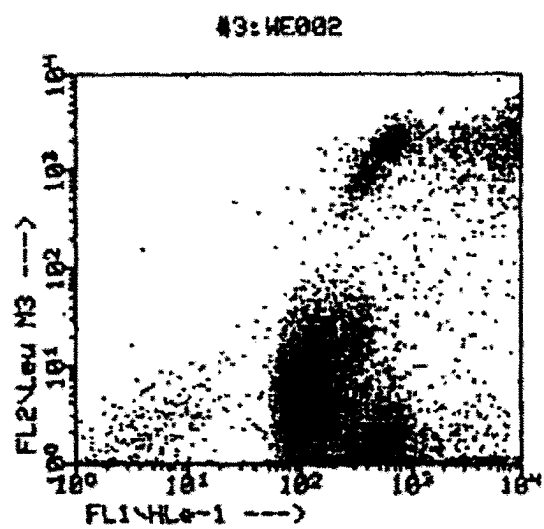
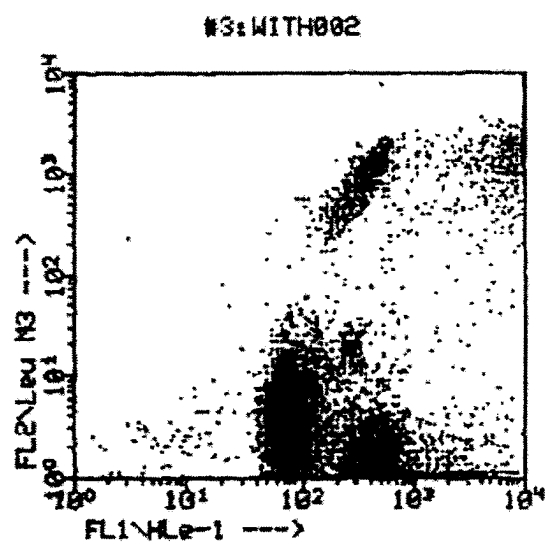
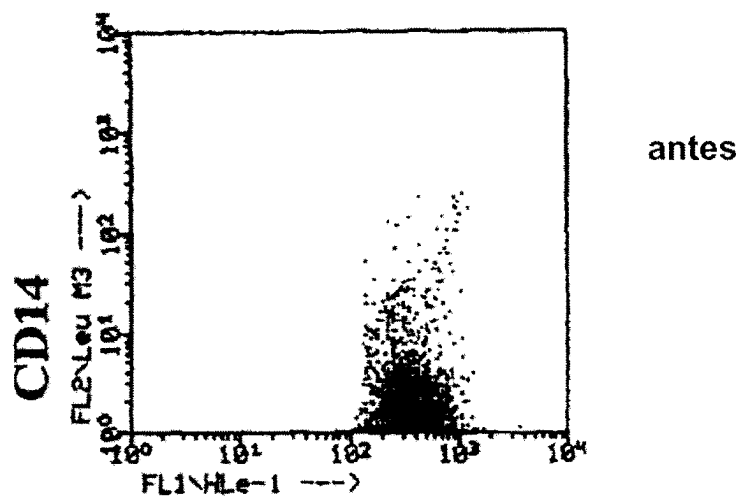


CELULA MADRE INFOIDEA



CELULA MADRE MIELOIDEA





CD45

FIG. 7

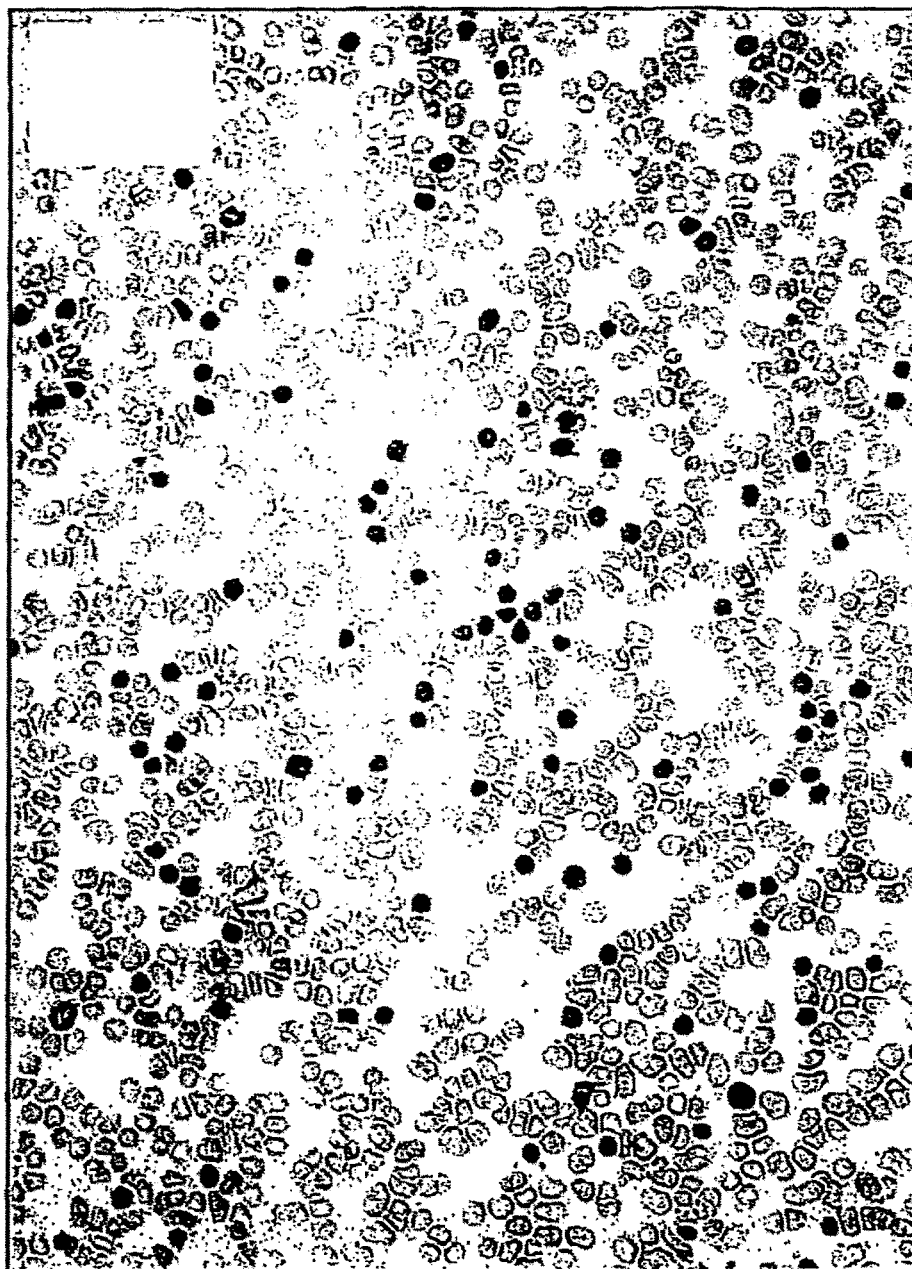


FIG. 8

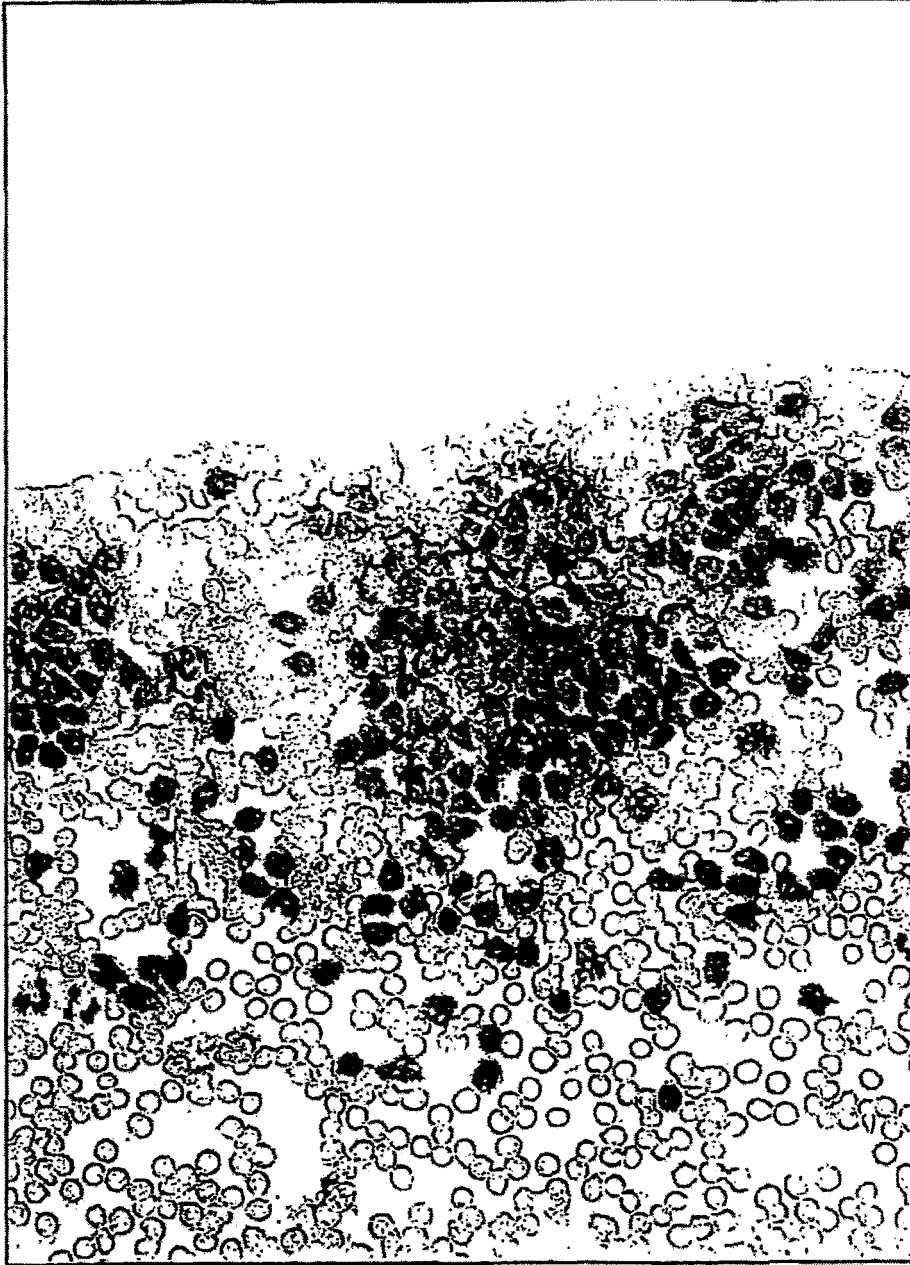


FIG. 9

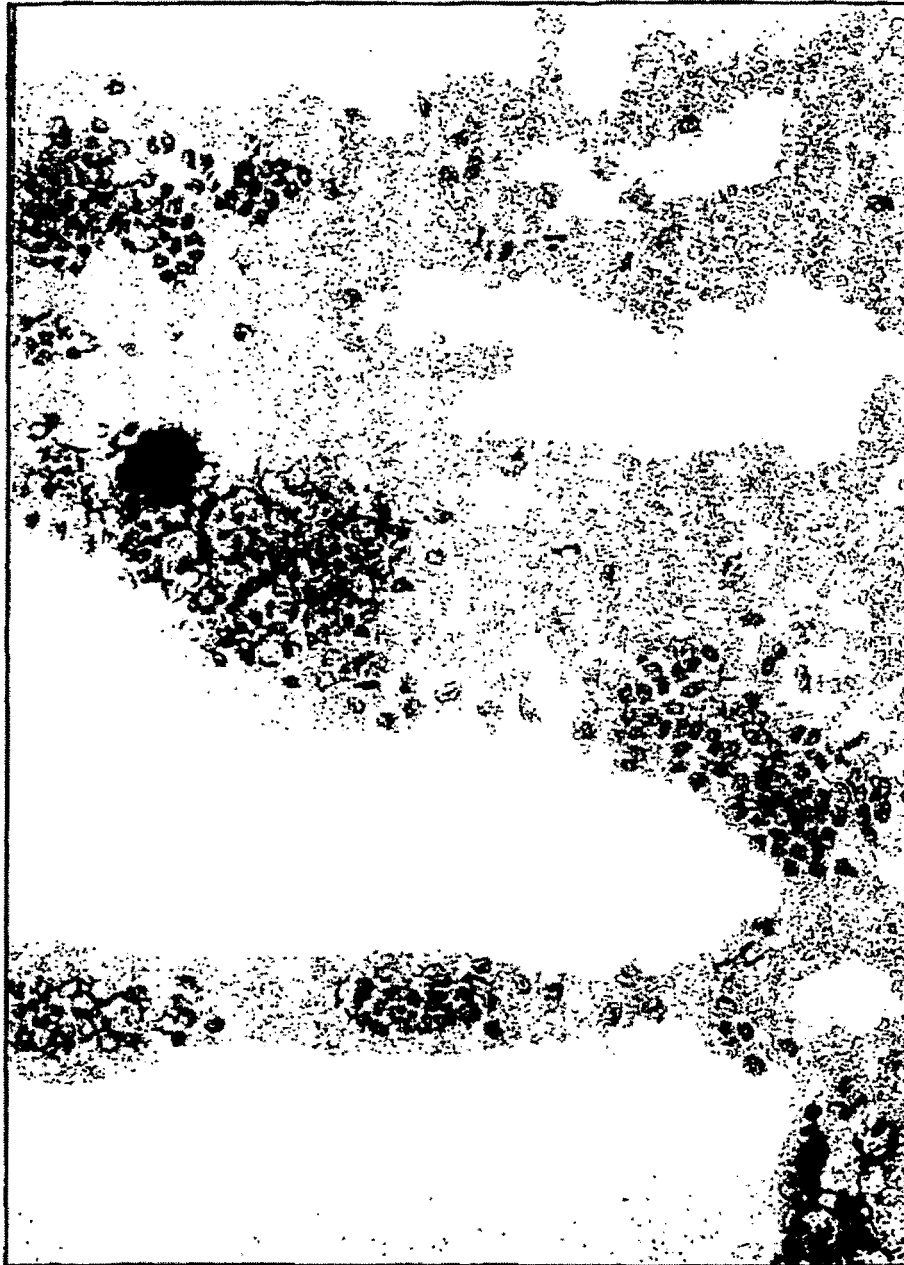


FIG. 10

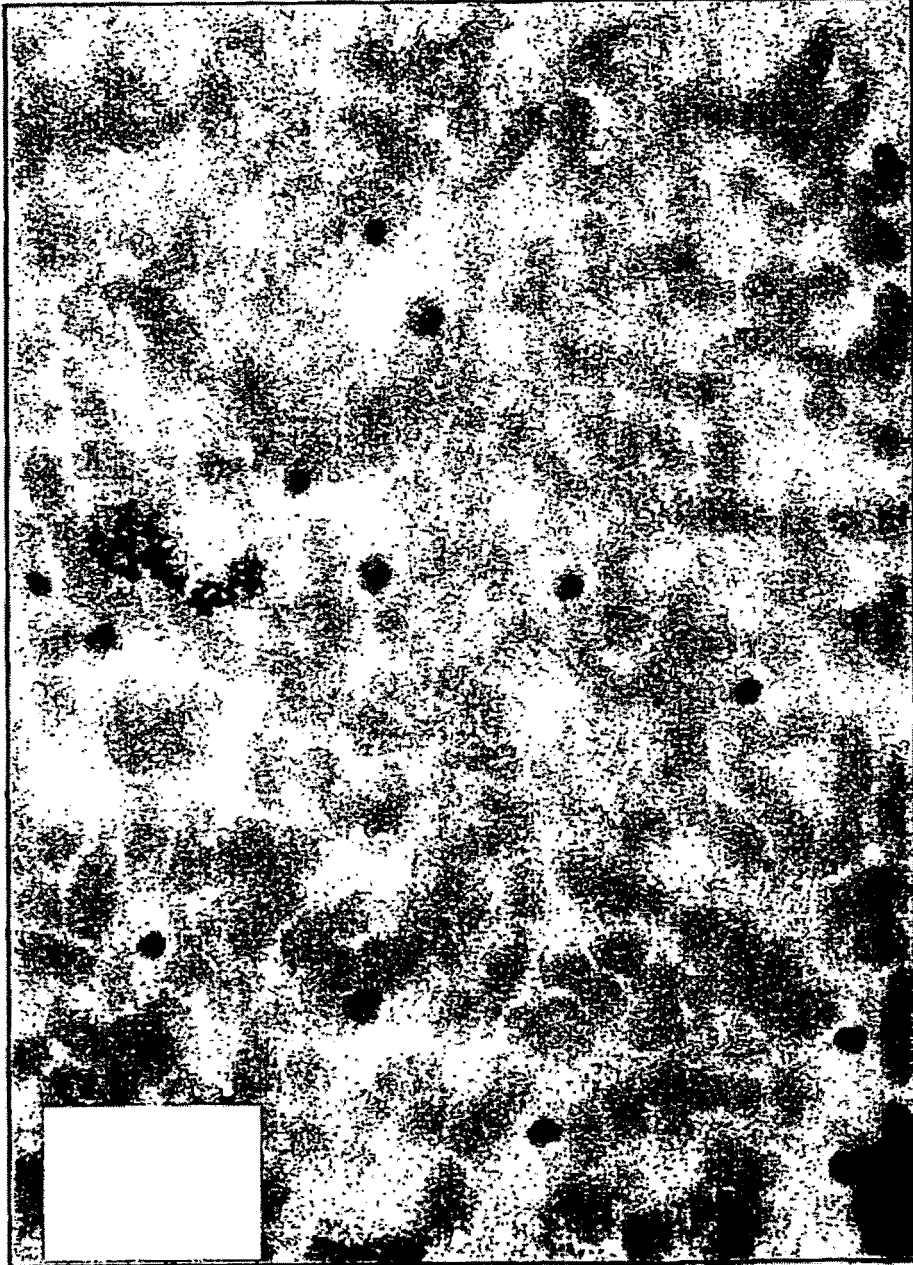


FIG. 11



FIG. 12

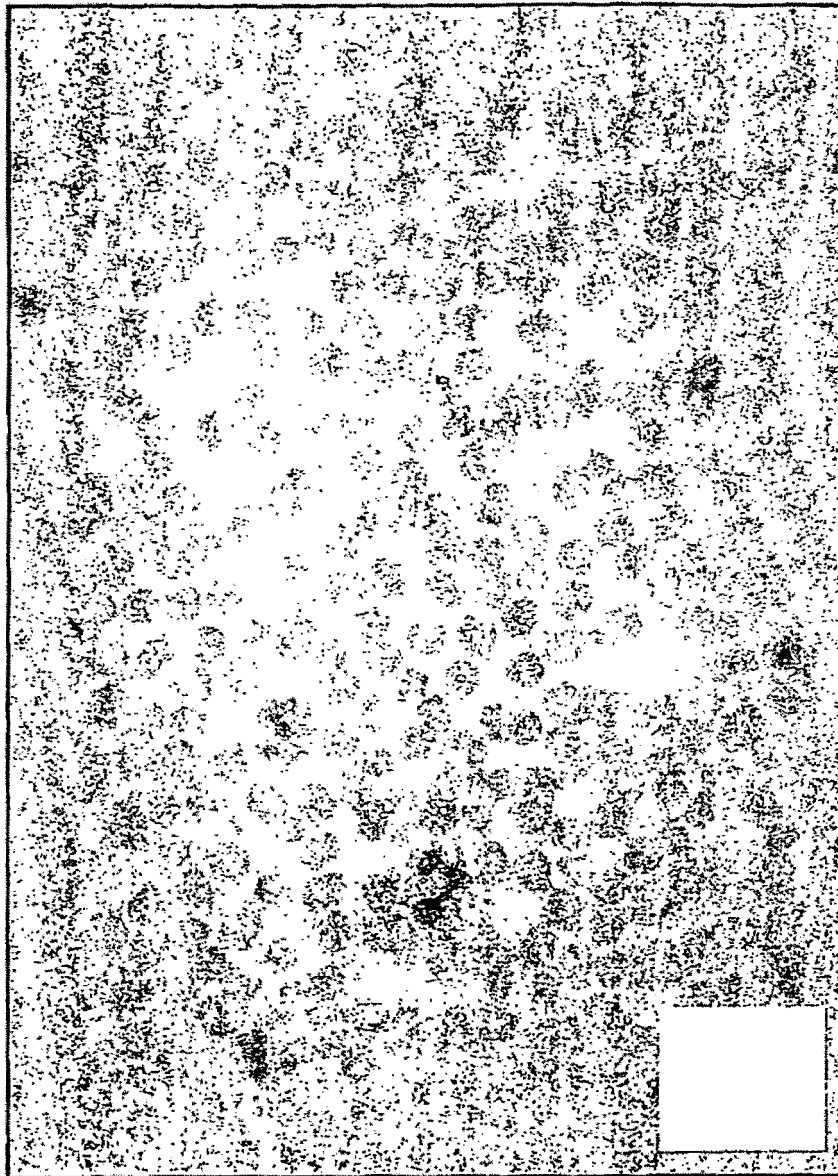


FIG. 13

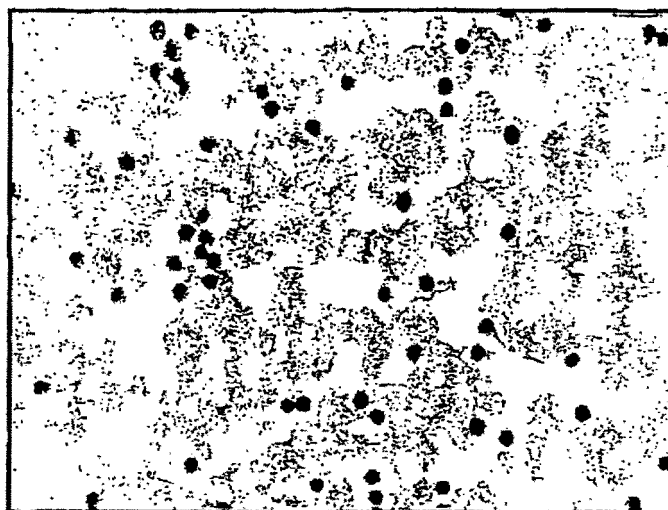


FIG. 14A



FIG. 14B

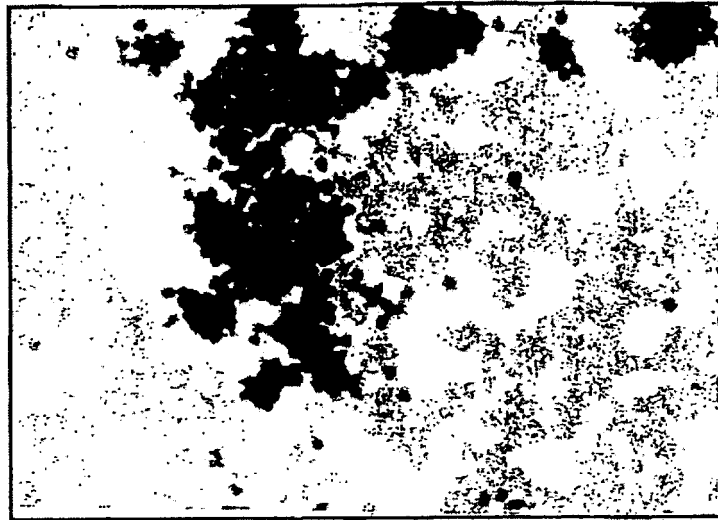


FIG. 15A

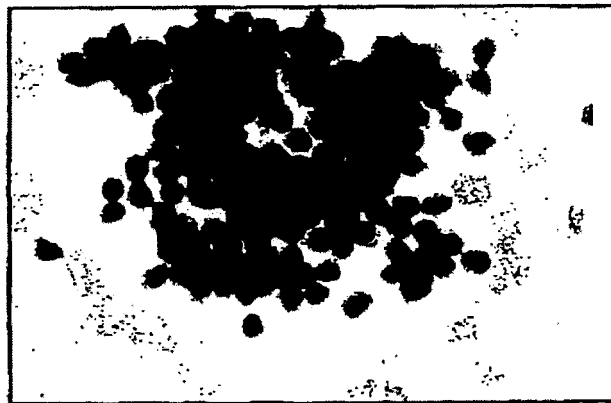


FIG. 15B

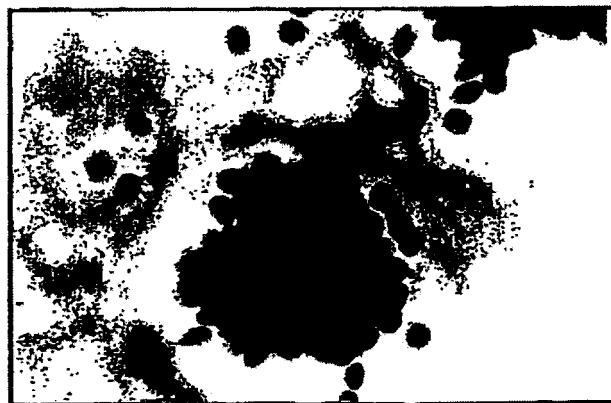


FIG. 15C

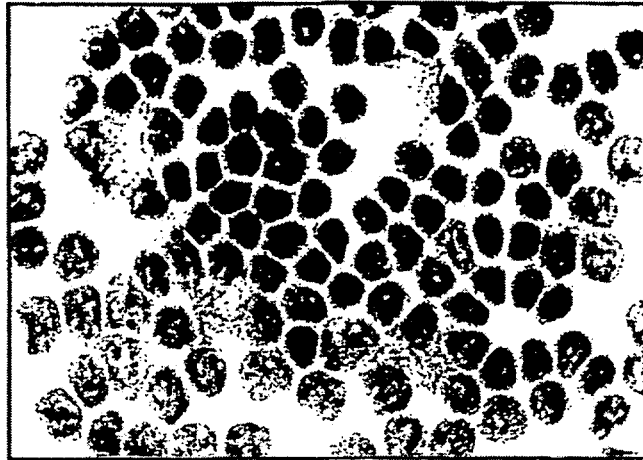


FIG. 16A



FIG. 16B



FIG. 16C



FIG. 17A

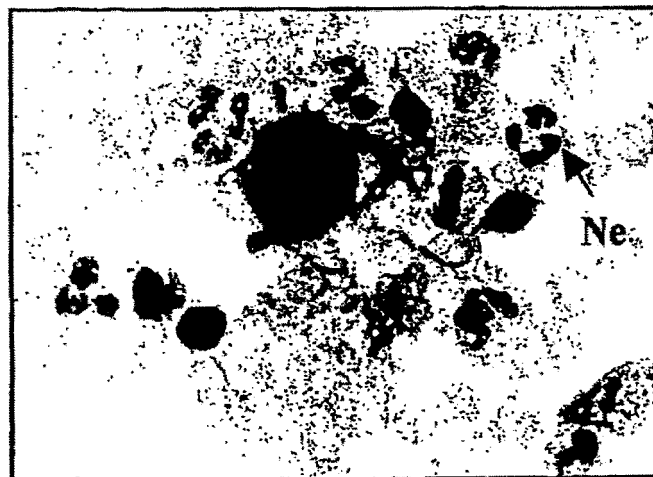


FIG. 17B



FIG. 17C



FIG. 17D

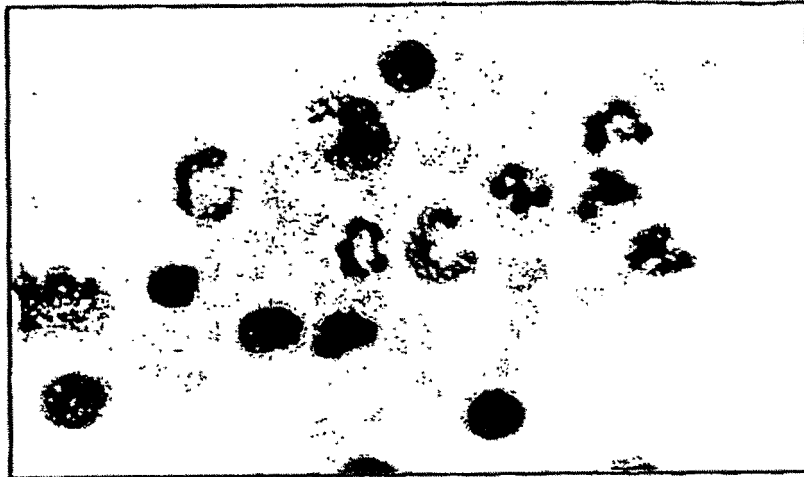


FIG. 17E



FIG. 17F



FIG. 17G

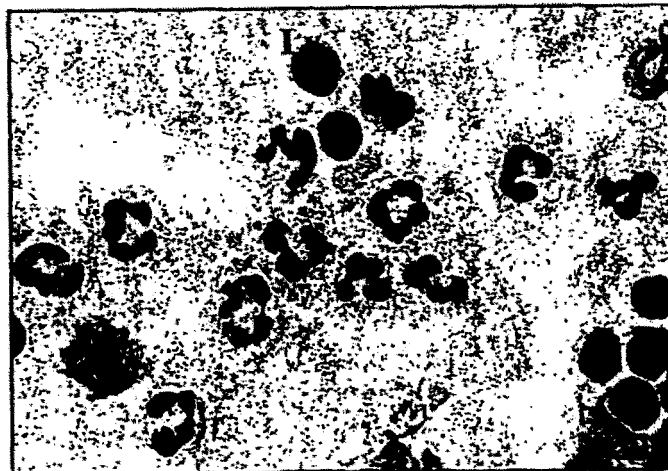


FIG. 17H

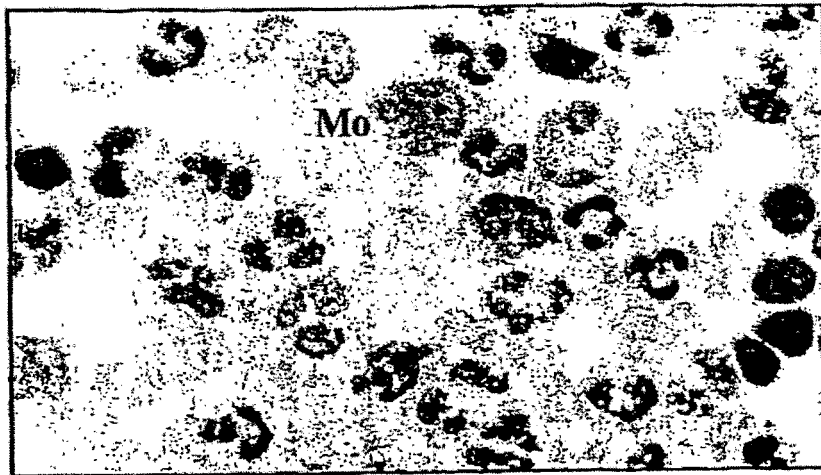


FIG. 17I



FIG. 17J

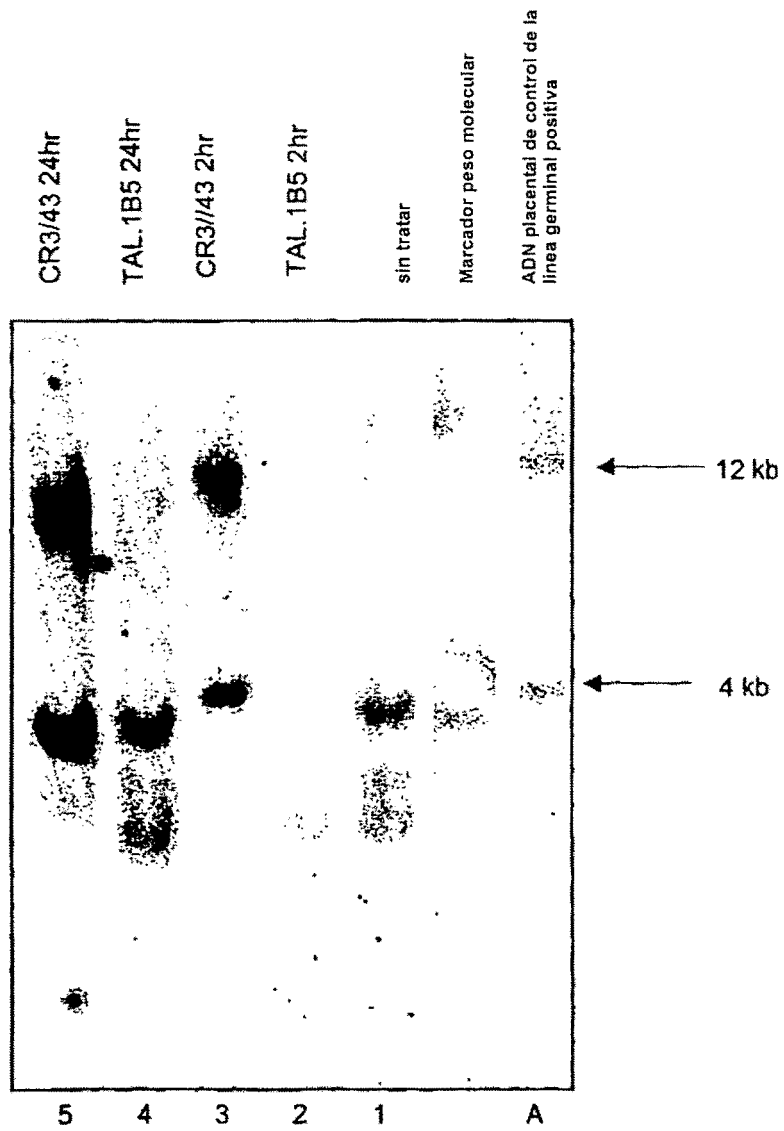


FIG. 18

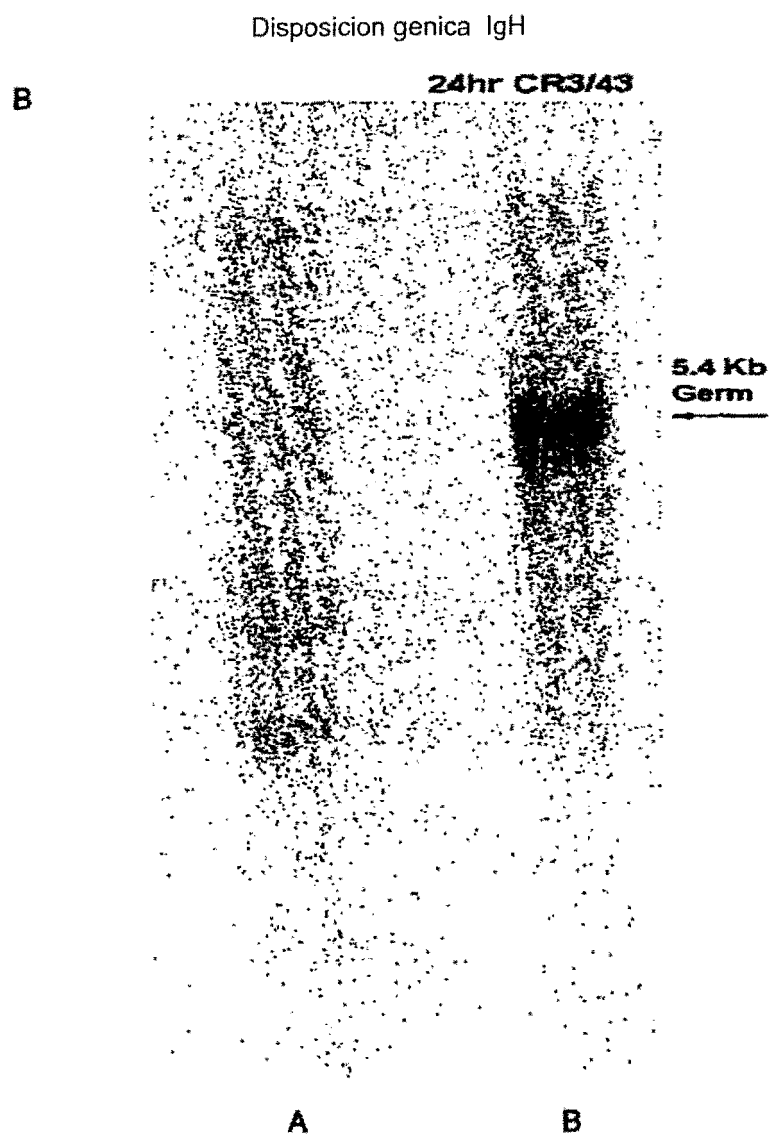
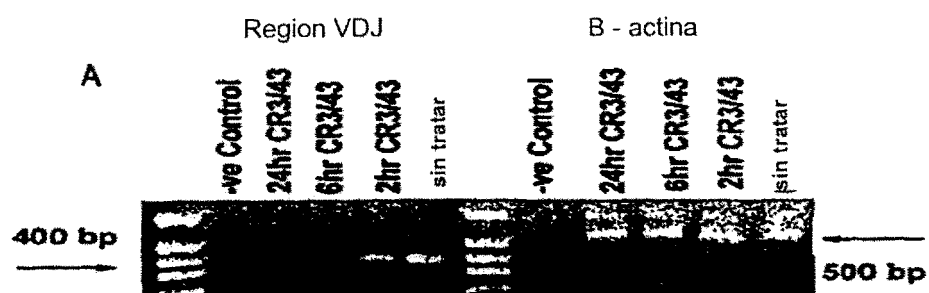


FIG. 19

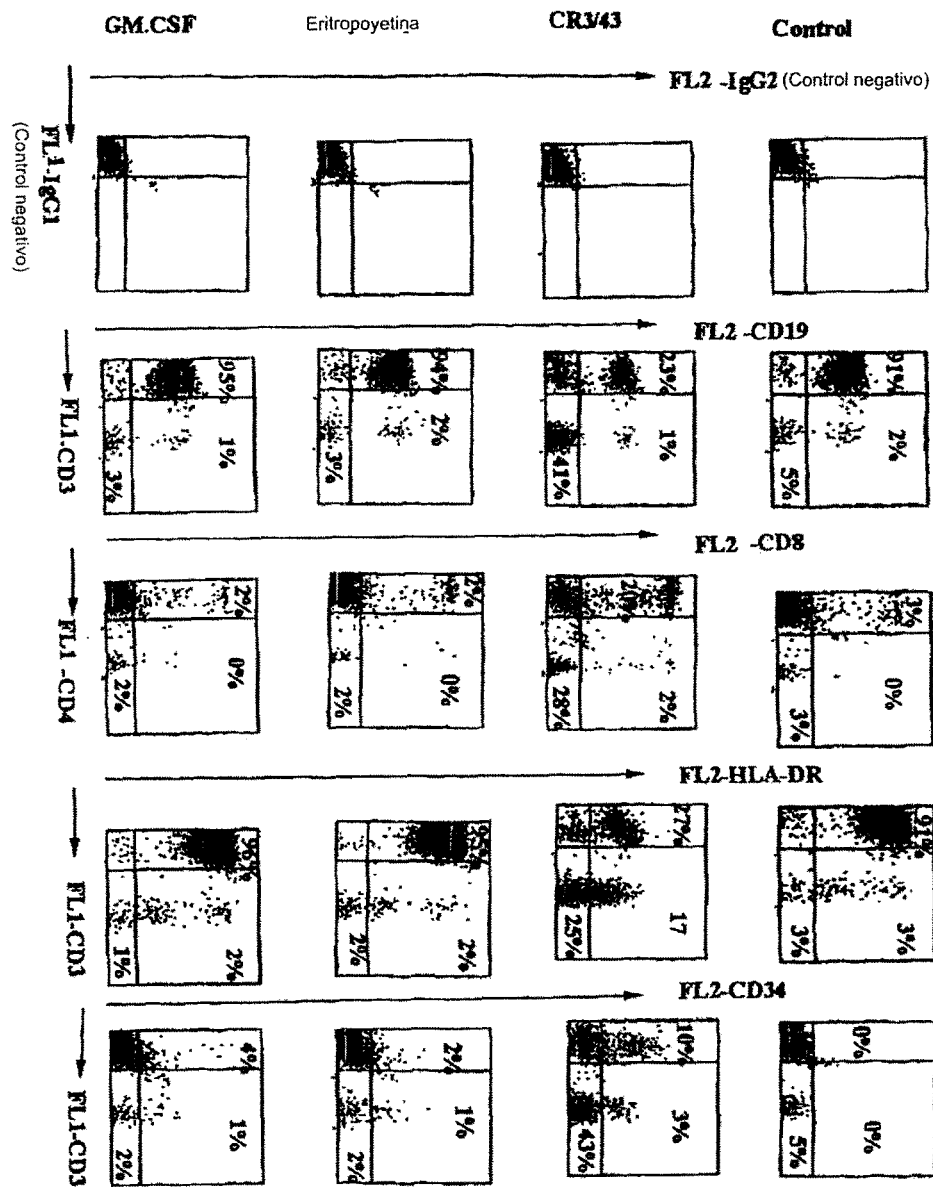
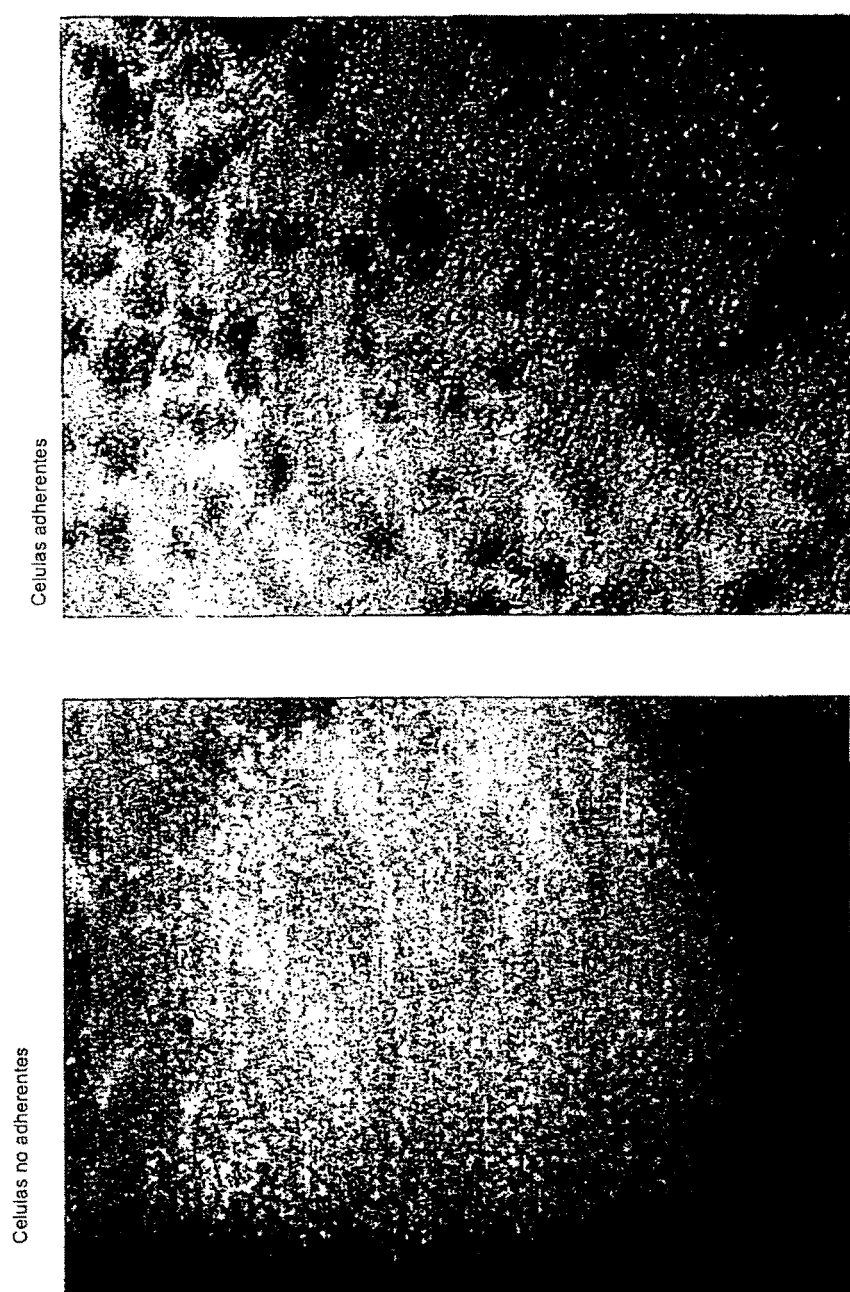


FIG. 20



Ensayo clónico

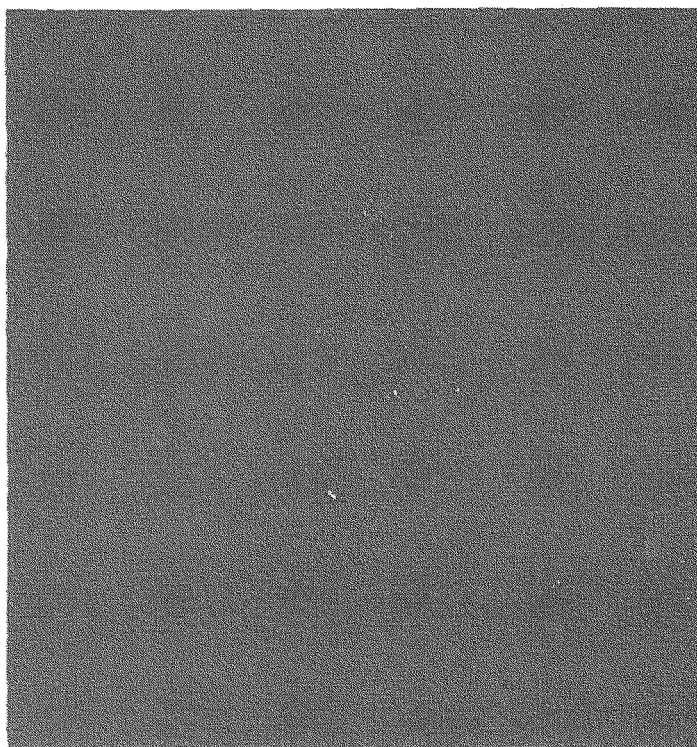
FIG. 21



Cultivo largo plazo (capa leucocítica)

FIG. 22

Linfocitos B antes de tratamiento
con mab CD3/43



Linfocitos B antes de tratamiento
con mab CD3/43

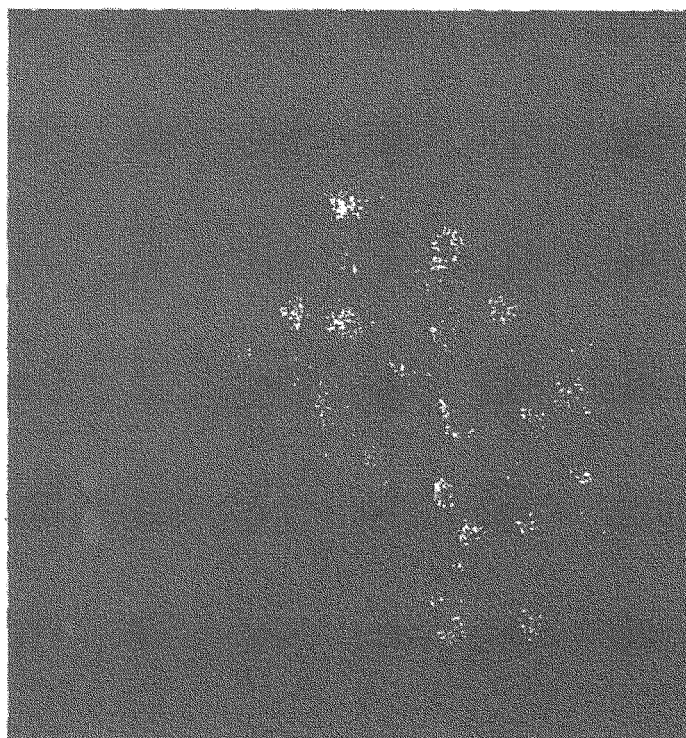


FIG. 23