



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 308 774**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **96901432 .3**

⑨6 Fecha de presentación : **31.01.1996**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **0807166**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.1997**

⑤4 Título: **Un método de elaboración de una célula indiferenciada.**

③0 Prioridad: **02.02.1995 GB 9502022**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

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: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Un método de elaboración de una célula indiferenciada.

En la presente memoria se describe un método para preparar una célula indiferenciada.

La presente invención se refiere a un método para preparar una célula indiferenciada a partir de una célula más comprometida.

En la presente invención se describe el uso de la célula indiferenciada de la presente invención para preparar una célula más comprometida, esto es, una célula comprometida.

También se describe el uso de la célula indiferenciada de la presente invención o la célula comprometida de la presente invención para que tenga un efecto (directa o indirectamente a través de la utilización de los productos obtenidos de la misma) sobre el sistema inmunitario, tal como el alivio de los síntomas asociados a una enfermedad o afección inmunitaria, o la cura parcial o completa de la misma.

A modo de introducción, la diferenciación es un proceso por el cual las estructuras y funciones de las células se comprometen progresivamente para originar una célula más especializada, tal como la formación de los linfocitos T o B. Por lo tanto, como las células se encuentran más comprometidas, se especializan más.

Por el contrario, la retrodiferenciación es un proceso por el cual las estructuras y funciones de las células van cambiando progresivamente para originar células menos especializadas.

Las células indiferenciadas son capaces de diferenciarse en varias estirpes: esto es, son capaces de diferenciarse en dos o más tipos de células especializadas. Un ejemplo típico de una célula indiferenciada es una célula troncal o célula madre.

Por el contrario, las células diferenciadas son incapaces de diferenciarse en varias estirpes. Un ejemplo típico de una célula diferenciada es una célula T.

Se pueden encontrar muchas células indiferenciadas y diferenciadas *in vivo* y la técnica general está repleta de enseñanzas generales sobre ellas.

Por ejemplo, se puede hacer referencia, entre otros, a Levitt y Merteisman, 1985 (*Haematopoietic stem cells*, publicado por Marcel Dekker Inc, sobre todo las páginas 45-59) y Roitt *et al.* (*Immunology 4th Edition*, Roitt, Brostoff y Male, Eds, 1996, publicado por Mosby, sobre todo el capítulo 10).

Sin embargo, de manera resumida, los ejemplos de células indiferenciadas incluyen células progenitoras linfohematopoyéticas (CPL). Las CPL incluyen las células troncales pluripotentes (CTP), las células troncales linfoides (CTL) y las células troncales mieloides (CTM). Las CTL y las CTM se forma cada una de ellas por la diferenciación de las CTP. Por tanto, las CTL y CTM están más comprometidas que las CTP.

Ejemplos de células diferenciadas 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.

Las células T y las células B se forman por la diferenciación de las CTL. Así, las células T y las células B están más comprometidas que las CTL.

Eosinófilos, basófilos, neutrófilos, megacariocitos, monocitos, eritrocitos, granulocitos, mastocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK) y linfocitos se forman por la diferenciación de las CTM. Así, cada uno de estas células está más comprometida que las CTM.

Los antígenos están asociados a células indiferenciadas y diferenciadas. El término "asociado" significa aquí que las células expresan o son capaces de expresar, o presentan o son capaces de ser inducidas para presentar, o comprenden, el(los) antígeno(s) respectivo(s).

La mayoría de las células indiferenciadas y diferenciadas comprenden antígenos de clase I y/o antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Si estos antígenos se asocian a dichas células, entonces se denominan células de clase I⁺ y/o clase II⁺.

Cada antígeno específico que se asocia a una célula indiferenciada o a una célula diferenciada puede actuar como un marcador. Por lo tanto, se pueden distinguir los distintos tipos de células unos de otros sobre la base de su(s) antígeno(s) asociado(s) concreto(s) o sobre la base de una combinación particular de antígenos asociados.

Ejemplos de estos antígenos marcadores incluyen los antígenos CD34, CD19 y CD3. Si estos antígenos están presentes, entonces estas células en particular se denominan células CD34⁺, CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente. Si estos antígenos no están presentes, entonces estas células se denominan células CD34⁻, CD19⁻ y CD3⁻, respectivamente.

En más detalle, las CTP son células CD34⁺. Las CTL son células DR⁺, CD34⁺ y TdT⁺. Las CTM son células DR⁺, CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD7⁺ y TdT⁺. Las células B son células CD19⁺, CD21⁺, CD22⁺ y DR⁺. Las células T son células CD2⁺, CD3⁺ y o bien CD4⁺ o CD8⁺. Los linfocitos inmaduros son CD4⁺ y CD8⁺. Las células T activadas son células DR⁺. Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son células CD56⁺ y CD16⁺. Los linfocitos T son células CD7⁺. Los leucocitos son células CD45⁺. Los granulocitos son células CD13⁺ y CD33⁺. Las células de macrófago monocítico son células CD14⁺ y DR⁺.

Por lo tanto, al buscar la presencia de los marcadores antigénicos antes mencionados es posible identificar ciertos tipos de células (por ejemplo, si son, o no, células indiferenciadas o células diferenciadas) y la especialización de este tipo de célula (por ejemplo, si se trata de una célula B o una célula T).

El concepto general de retrodiferenciación no es nuevo. De hecho, en 1976, José Uriel (*Cancer Research*, 36, 4269-4275, noviembre 1976) presentó una revisión de este tema, en la que dijo:

“la retrodiferenciación aparece como un proceso adaptativo frecuente para el mantenimiento de la integridad celular frente a agentes perjudiciales de diversa etiología (física, química y vírica). Mientras que se preserva toda la información codificada en su genoma, las células en retrodiferenciación pierden complejidad funcional y morfológica en virtud de un proceso de autoeliminación de las estructuras citoplásmicas y la transmisión a un perfil de expresión génica más juvenil. Esto da lugar a una uniformización progresiva de los fenotipos celulares originalmente diferentes y a una disminución de la capacidad de respuesta a las señales reguladoras que operan en las células adultas. La retrodiferenciación está normalmente contrapesada por un proceso de reontogenia que tiende a restaurar los fenotipos terminales allí donde ha empezado la reversión. Esto explica por qué la retrodiferenciación permanece invariablemente asociada a la regeneración celular y la reparación de los tejidos”.

Uriel (*ibid*) pasó a explicar los casos descritos de retrodiferenciación tales como el trabajo de Gurdon, que se refería a los núcleos de las células epiteliales del intestino del renacuajo de *Xenopus* (*Advances in Morphogenesis* [1966] vol 4, pp. 1-43. New York Academic Press, Abercrombie y Bracher eds.), y el trabajo de Bresnick sobre la regeneración del hígado (*Methods in Cancer Research* [1971], vol 6, pp. 347-391).

Uriel (*ibid*) también describió un trabajo relacionado con las células aisladas del parénquima hepático para cultivos *in vitro*. Según Uriel:

“Contrariamente a los resultados con hepatocitos fetales o neonatales, con hepatocitos del hígado en regeneración, o de hepatomas establecidos, ha sido difícil obtener líneas celulares permanentes a partir de hepatocitos adultos en reposo”.

Uriel (*ibid*) también describió una aparente retrodiferenciación en el cáncer cuando afirmó:

“Los fenotipos bioquímicos de muchos tumores muestran cambios análogos a la reversión hacia la inmadurez [...] durante la fase preneoplásica de la carcinogenia de hígado, las células también se retrodiferencian”.

Los hallazgos más recientes sobre la retrodiferenciación incluyen el trabajo de Minoru Fukunda (*Cancer Research* vol 41, pp. 4621-4628). Fukunda indujo cambios específicos en el perfil de glucoproteínas de la superficie celular de las células leucémicas humanas K562 mediante la utilización del éster de forbol inductor de tumores, el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA). Según Fukunda, el TPA indujo a las células leucémicas humanas K562 a un estado de retrodiferenciación.

También, Hass *et al.* (*Cell Growth & Differentiation* [1991] vol 2, pp. 541-548) describieron que el cultivo a largo plazo de las células leucémicas U-937 diferenciadas con TPA en ausencia de éster de forbol durante 32 a 36 días dio lugar a un proceso de retrodiferenciación, y que las células retrodiferenciadas se despegaban del sustrato y reiniciaban la proliferación.

La patente internacional WO 93/25216 describe una población de células que comprenden células troncales humanas primitivas. La población de células se autorrenueva y es capaz de diferenciarse tanto en células troncales estromáticas como en células troncales hematopoyéticas. Esta población de células tiene el fenotipo CD34⁺/CD38⁻/HLA-DR⁻.

Otro caso de retrodiferenciación lo constituye el trabajo de Curtin y Snell (*Br J. Cancer* [1983], vol 48, pp. 495-505). Estos investigadores compararon los cambios enzimáticos que se producían durante la hepatocarcinogenia inducida por la dietilnitrosamina y la regeneración del hígado después de la hepatectomía parcial para la diferenciación normal del hígado. Estos investigadores encontraron cambios en las actividades enzimáticas durante la carcinogenia que eran similares a una reversión de la diferenciación por etapas. Según los investigadores, sus resultados sugieren que el proceso de retrodiferenciación subyacente es común tanto al proceso de hepatocarcinogenia como a la regeneración del hígado.

Más recientemente, Chastre *et al.* (*FEBS Letters* [1985] vol 188, núm. 2, pp. 2810-2811) describieron la retrodiferenciación del subclón HT29-18 de cáncer de colon humano.

Aún más recientemente, Kobayashi *et al.* (*Leukemia Research* [1994] vol 18, núm. 12, pp. 929-93) han descrito el establecimiento de una línea celular retrodiferenciada (D-1) a partir de una única célula de leucemia mielomonocítica de rata que se diferenció en una célula de tipo macrófago por el tratamiento con lipopolisacáridos (LPS).

De acuerdo con los conocimientos actuales, como confirmación de las enseñanzas encontradas en la página 911 de *Molecular Biology of the Cell* (publicado por Garland Publishers Inc, 1993) y más recientemente Levitt y Mertelsman (véase anteriormente), una célula troncal, tal como una CTP, tiene las siguientes características:

1) Es una célula indiferenciada, esto es, no se ha diferenciado totalmente.

2) Tiene la capacidad de dividirse sin limite.

3) Tiene la capacidad de originar una progenie diferenciada, tal como las células diferenciadas mencionadas previamente. Y

4) cuando se divide, cada célula hija tiene una elección: puede permanecer como una CTP como su progenitora, o se puede embarcar en un camino que la conduzca a la diferenciación terminal.

Se debe destacar la última característica, esto es, que de acuerdo con las enseñanzas generales en la técnica, una vez que la célula indiferenciada se ha diferenciado en una célula más comprometida, ya no se puede retrodiferenciar. Este conocimiento estaba incluso apoyado por las enseñanzas de Uriel (*ibid.*) Fukunda (*ibid.*), Hass *et al.* (*Ibid.*), Curtin y Snell (*Ibid.*), Chastre *et al.* (*Ibid.*) y Kobayashi *et al.* (*Ibid.*) puesto que estos investigadores retrodiferenciaron ciertos tipos de células diferenciadas, pero en los que estas células permanecieron comprometidas con la misma estirpe y no se retrodiferenciaron en células indiferenciadas.

Por lo tanto, según se afirma en la técnica anterior a la presente invención, se creía que no era posible formar células indiferenciadas, tales como células troncales, a partir de células comprometidas. Sin embargo, la presente invención muestra que esta creencia no es exacta y que es posible formar células indiferenciadas a partir de células más comprometidas.

La invención proporciona un método *in vitro* para preparar una célula sin diferenciar, comprendiendo el método poner en contacto una célula más comprometida que comprende un receptor HLA-DR con un agente que se acopla operativamente al receptor, por lo que hace que una célula más comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada CD34⁺, en la que el agente es un anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del HLA-DR.

También se describe un método que comprende poner en contacto una células más comprometida con un agente que causa la retrodiferenciación de la célula más comprometida en una célula indiferenciada: y a continuación comprometiendo a la célula indiferenciada en una célula recomprometida.

Así, en el sentido más amplio, la presente invención se basa en el muy sorprendente hallazgo de que es posible formar una célula indiferenciada a partir de una célula más comprometida.

La presente invención es muy ventajosa ya que ahora es posible preparar células indiferenciadas a partir de células más comprometidas y entonces utilizar estas células indiferenciadas como medicamentos, o usarlas para prepararlos, tanto *in vitro* como *in vivo*, o combinaciones de los mismos, para el tratamiento de trastornos.

La presente invención también es ventajosa porque es posible convertir la célula indiferenciada preparada por retrodiferenciación en una célula recomprometida o para corregir o retirar un producto de la misma.

El término "célula recomprometida" se refiere a una célula derivada de la célula indiferenciada, esto es, una célula más comprometida nueva.

Preferiblemente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula indiferenciada con CMH de clase I⁺ o con CMH de clase II⁺.

Preferiblemente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula indiferenciada que comprende un antígeno de célula troncal.

Preferiblemente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula progenitora linfohematopoyética.

Preferiblemente, la célula más comprometida es capaz de retrodiferenciarse en una célula troncal pluripotente.

La célula indiferenciada puede comprometer a cualquier componente que esté implicado en la presentación, captura o reconocimiento de antígenos. La célula indiferenciada es una célula con CMH de clase II⁺. Las células con CMH de clase I⁺ también se describen en la presente memoria.

ES 2 308 774 T3

Preferiblemente, la célula indiferenciada comprende un antígeno de célula troncal.

La célula más comprometida puede comprender cualquier componente que esté implicado en la presentación, captura o reconocimiento del antígeno. La célula más comprometida es una célula con CMH de clase II⁺. Las células con CMH de clase I⁺ también se describen en la presente memoria.

El agente actúa por fuera de la célula más comprometida.

Preferiblemente, la célula más comprometida comprende un receptor HLA-DR que es acoplable operativamente por el agente, y en el que el agente se acopla operativamente al receptor.

Preferiblemente, el receptor HLA-DR comprende al menos las regiones homólogas de la cadena beta del HLA-DR.

Preferiblemente, el receptor comprende al menos las regiones homólogas de la cadena alfa del HLA-DR.

El agente es un anticuerpo monoclonal contra las regiones homólogas de la cadena beta del HLA-DR.

Preferiblemente, el agente se usa junto con un modificador de la respuesta biológica.

Preferiblemente, el modificador de la respuesta biológica es un agente alquilante.

Preferiblemente, el agente alquilante es o comprende ciclofosfamida.

En una realización preferida, la célula más comprometida es una célula diferenciada.

Preferiblemente, la célula más comprometida es, o bien una célula T, o una célula B.

En una realización preferida alternativa, la célula más comprometida es una célula indiferenciada más madura.

En una realización preferida, cuando la célula indiferenciada se compromete en una célula recomprometida, la célula recomprometida es de la misma estirpe que la célula más comprometida antes de la retrodiferenciación.

En otra realización preferida, cuando una célula indiferenciada está comprometida en una célula recomprometida, la célula recomprometida es de una estirpe diferente a la de la célula más comprometida antes de la retrodiferenciación.

Preferiblemente, la célula recomprometida es una célula B, una célula T o un granulocito.

Preferiblemente, el agente modula la expresión génica del CMH, preferiblemente en el que el agente modula la expresión del CMH de clase I⁺ y/o CMH de clase II⁺.

El agente se acopla operativamente a la célula más comprometida para retrodiferenciarla en una célula indiferenciada. Desde este punto de vista, el agente para la retrodiferenciación de la célula más comprometida en una célula indiferenciada puede actuar en acoplamiento directo o en acoplamiento indirecto con la célula más comprometida.

Un ejemplo del acoplamiento directo es cuando la célula más comprometida tiene al menos un receptor de superficie celular en su superficie celular, tal como la cadena beta que tiene regiones homólogas (regiones que se encuentran con frecuencia que tienen la misma secuencia o una similar) tales como los que se pueden encontrar en las células B, en el que el agente se acopla directamente al receptor de la superficie celular. Otro ejemplo es cuando una célula más comprometida tiene un receptor de superficie celular en la superficie celular, tal como una cadena alfa que tiene regiones homólogas tales como las que se pueden encontrar en las células T, o en el que el agente se acopla directamente al receptor de la superficie celular.

Un ejemplo de acoplamiento indirecto es cuando una célula más comprometida tiene al menos dos receptores de superficie celular en la superficie celular y el acoplamiento del agente con uno de los receptores afecta al otro receptor, que induce la retrodiferenciación de la célula más comprometida.

El agente para la retrodiferenciación de la célula más comprometida en una célula indiferenciada puede ser un compuesto o composición químico. El agente es capaz de acoplarse al receptor HLA-DR sobre la superficie de la célula más comprometida.

El agente de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal frente a la región homóloga de la cadena beta del HLA-DR. También se describen en la presente memoria los anticuerpos contra uno o más de: la cadena beta del antígeno de clase II del CMH, la cadena alfa de antígeno de clase I o de clase II del CMH, la cadena alfa del antígeno HLA-DR, la cadena alfa y la cadena beta del antígeno de clase II del CMH o de un antígeno de clase I del CMH. Un ejemplo de un anticuerpo adecuado es el CF3/43 (comercializado por DAKO).

La célula más comprometida es una célula derivada o derivable de una célula indiferenciada.

Por lo tanto, en una realización preferida, la célula más comprometida es también una célula indiferenciada. Por eso, mediante un ejemplo, la célula indiferenciada puede ser una célula troncal linfóide o una célula troncal mieloide, y la célula indiferenciada es una célula troncal pluripotente.

En la presente memoria se describen más células comprometidas que son células diferenciadas, tales como una CFC de células T, una CFC de células B, una CFC de eosinófilos, una CFC de basófilos, una CFC de células GM, una CFC de megacariocitos, una BFC de eritrocitos, una CFC de eritrocitos, una célula T, una célula B, un eosinófilo, un basófilo, un neutrófilo, un monocito, un megacariocito o un eritrocito; la célula indiferenciada es una célula troncal mieloide, una célula troncal linfóide o una célula troncal pluripotente.

En la presente memoria se describe una célula comprometida que es una célula diferenciada en la que la célula diferenciada es un linfoma B (activado o sin activar), un linfocito T (activado o sin activar), una célula de la estirpe de los monocitos macrófagos, una célula nucleada capaz de expresar antígenos de clase I o de clase II, una célula que se puede incluir para expresar antígenos de clase I o de clase II, o una célula enucleada (por ejemplo, una célula que no contiene un núcleo, tal como un glóbulo rojo).

En la presente memoria se describen células diferenciadas en la que la célula diferenciada se selecciona entre un grupo de células que comprenden linfocitos granulares grandes, linfocitos nulos o linfocitos citolíticos naturales, expresando cada una los receptores de superficie celular CD56 y/o CD16.

La célula diferenciada puede incluso estar formada por la nucleación de una célula enucleada.

El agente puede actuar intracelularmente dentro de la célula más comprometida. Sin embargo, preferiblemente, el agente actúa desde fuera de la célula más comprometida.

De acuerdo con la invención, el agente se acopla operativamente al receptor HLA-DR presente en la superficie de la célula más comprometida, pudiéndose expresar dicho receptor en la célula más comprometida, tal como un receptor que es capaz de expresarse en la célula más comprometida.

En la presente memoria también se describen receptores, en la que el receptor es un antígeno de clase I o de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y el receptor de superficie celular tal como un receptor HLA-DR, un receptor DM, un receptor DP, un receptor DQ, un receptor HLA-A, un receptor HLA-B, un receptor HLA-C, un receptor HLA-E, un receptor HLA-F o un receptor HLA-G.

En la presente memoria se describe una etapa de poner en contacto que comprende el agente de acoplamiento con uno cualquiera o más de los siguientes: regiones homólogas de la cadena alfa de los antígenos de clase I, regiones homólogas de la cadena alfa de los antígenos de clase II, un receptor de superficie celular CD4, un receptor de superficie celular CD8, regiones homólogas de la cadena beta de los antígenos de clase II en presencia de linfocitos, regiones homólogas de la cadena alfa de los antígenos de clase I en presencia de linfocitos, o regiones homólogas de la cadena alfa de los antígenos de clase II en presencia de linfocitos.

Preferiblemente, la etapa de poner en contacto se produce en presencia del modificador de la respuesta biológica.

Preferiblemente, el modificador de la respuesta biológica es uno cualquiera o más de un modulador, tal como un inmunomodulador, un factor de crecimiento, una citocina, un receptor de superficie celular, una hormona, un ácido nucleico, una secuencia de nucleótidos, un antígeno o un péptido.

En una realización preferida de la presente invención, la célula indiferenciada está comprometida en una célula recomprometida, tal como una célula diferenciada.

La célula recomprometida puede ser de la misma estirpe que la célula más comprometida de la cual se deriva la célula indiferenciada.

Alternativamente, la célula recomprometida puede ser de una estirpe diferente a la de la célula más comprometida a partir de la cual se deriva la célula indiferenciada.

También se describe en la presente memoria un método para preparar una célula indiferenciada, en la que el método incluye comprometer la célula indiferenciada en una célula recomprometida y entonces fusionar la célula recomprometida con un mieloma. Esto permite la expresión *in vitro* de grandes cantidades del producto considerado, tal como un anticuerpo o un antígeno o una hormona, etc.

También se describe en la presente memoria lo siguiente:

La utilización de uno de los agentes de la presente invención para preparar una célula indiferenciada a partir de una célula más comprometida.

La utilización de una célula indiferenciada producida según el método de la presente invención para producir uno cualquiera de un anticuerpo monoclonal, o policlonal, o específico, a partir de un linfocito B, o un linfocito T; una

célula a partir de la estirpe de monocitos macrófagos; una célula enucleada capaz de expresar antígenos de clase I o de clase II; una célula capaz de ser inducida para expresar antígenos de clase I o clase II; una célula enucleada; una célula fragmentada; o una célula apoptósica.

- 5 La utilización de una célula indiferenciada producida según el método de la presente invención para producir linfocitos T efectoras a partir de linfocitos B y/o viceversa.

La utilización de una célula indiferenciada producida según el método de la presente invención para producir uno o más de: un medicamento, tal como un medicamento que comprende, o que está formado por, un linfocito B, un
10 linfocito T, una célula de la estirpe de monocitos macrófagos, una célula nucleada capaz de expresar antígenos de clase I o clase II, una célula capaz de ser inducida para expresar un antígeno de clase I o de clase II, o una célula enucleada.

15 Procesos que utilizan los usos antes mencionados y los productos o composiciones preparadas de tales procesos.

Un medicamento que comprende una célula indiferenciada o un producto obtenido de la misma mezclado con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado.

20 El medicamento puede comprender un anticuerpo o antígeno obtenido de una célula indiferenciada mezclada con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado.

25 El medicamento puede ser para el tratamiento de uno cualquiera de: cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos sanguíneos, regeneración tisular o celular, regeneración de órganos, tratamiento de trasplantes de órganos o tejidos, o trastornos metabólicos congénitos.

Un procedimiento para introducir un gen en un genoma de una célula indiferenciada, en el que el procedimiento comprende introducir el gen en una célula más comprometida y luego preparar la célula indiferenciada mediante el método de acuerdo con la presente invención, por medio de lo cual el gen está presente en la célula indiferenciada.

30 También se describe un procedimiento para introducir un gen en el genoma de una célula indiferenciada, en el que el procedimiento comprende insertar el gen en el genoma de una célula más comprometida y luego preparar una célula indiferenciada mediante el método según la presente invención, por medio de lo cual el gen está presente en la célula indiferenciada.

35 En la presente memoria se describe un procedimiento para introducir el genoma de un gen en una célula indiferenciada, en el que el procedimiento comprende insertar el gen en el genoma de una célula más comprometida y luego preparar la célula indiferenciada mediante el método de acuerdo con la presente invención, por medio de lo cual el gen está presente en el genoma de la célula indiferenciada.

40 En la presente memoria se describe una célula indiferenciada preparada mediante uno cualquiera de estos procedimientos de la presente invención.

45 Como ya se ha mencionado, en la presente memoria se describe un medicamento que comprende una célula indiferenciada preparada por uno cualquiera de estos procedimientos mezclado con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado. Con tal medicamento, la célula indiferenciada se podría usar para producir una célula más comprometida beneficiosa, tal como una que tenga una estructura genómica correcta, para aliviar los síntomas o afecciones debidas o asociadas a una célula más comprometida que tiene una estructura genómica incorrecta.

50 En la presente memoria se describe un procedimiento para retirar una mutación adquirida de una célula más comprometida, en el que el método comprende formar una célula indiferenciada mediante el método según la presente invención y comprometer la célula indiferenciada en una célula recomprometida, por medio de lo cual se retira la mutación introducida mediante el ordenamiento o reordenamiento del genoma y/o núcleo de la célula.

55 El gen se puede insertar en el gen de la región de la inmunoglobulina o la región del RCT del genoma.

Alternativamente, la célula indiferenciada se podría usar para producir una célula más comprometida que produzca una entidad que cure cualquier síntoma o afección ocasionada por, o asociada a, una célula más comprometida que tiene una estructura genómica incorrecta.

60 Por ejemplo, la presente invención se puede usar para preparar anticuerpos o receptores de células T para un antígeno que se expresa en una célula más comprometida que se ha retrodiferenciado en la célula indiferenciada. Desde este punto de vista, el antígeno puede ser un antígeno fetoespecífico o un antígeno fetoespecífico de reacción cruzada.

65 También se describe un procedimiento para controlar la cantidad de células indiferenciadas y células más comprometidas. Por ejemplo, se describe un método que comprende la formación de una célula indiferenciada mediante el método según la presente invención y luego la activación de un gen de la apoptosis para alterar la célula indiferenciada, tal como ocasionar la muerte de la misma.

En una realización preferida de la presente invención, la célula más comprometida no es una célula cancerosa. En otra realización preferida de la presente invención, el agente no es ni neoplásico ni capaz de promover el crecimiento del cáncer.

También se describe en la presente memoria un método para tratar un paciente que padece una enfermedad o trastorno debido a una célula defectuosa o una célula no deseada, comprendiendo el método la preparación de una célula indiferenciada al poner el contacto una célula más comprometida con un agente que hace que la célula más comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada y luego, opcionalmente, comprometer la célula indiferenciada en una célula recommitida; en el que la célula indiferenciada, o la célula recommitida, afecta a la célula defectuosa o a la célula no deseada y se alivian los síntomas de la enfermedad o trastorno o se cura al paciente de la enfermedad o afección.

En resumen, la presente invención se refiere a la preparación de una célula indiferenciada a partir de una célula más comprometida.

Las siguientes figuras y ejemplos son útiles para comprender la invención.

La figura 1 es una imagen al microscopio de las células antes del método de la invención.

La figura 2 es una imagen al microscopio de las células preparadas por el método de la presente invención.

La figura 3 es una imagen al microscopio de las células preparadas por el método de la presente invención, pero a menos aumentos.

La figura 4 es una imagen al microscopio de las células antes del método de la presente invención.

La figura 5 es una imagen al microscopio de las células preparadas por el método de la presente invención.

La figura 6 es una imagen al microscopio de las células preparadas por el método de la presente invención.

A. Materiales y métodos

Pacientes

Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos de tapón lavanda que contienen EDTA a partir de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B, pacientes con falta de anticuerpos (incluida la deficiencia de IgA y las hipogammaglobulinemias infantiles ligadas al cromosoma X), pacientes con infecciones del VIH y síndrome del SIDA, un paciente con infección por CMV, un paciente con linfomas de Hodgkin, un paciente con leucemia aguda de células T, un bebé de 6 días con linfomas de Hodgkin, un paciente con leucemia aguda de células T, un bebé de 6 días con blastocitosis, distintos pacientes con diversas infecciones y cuadros clínicos, sangre de cordón umbilical, médulas óseas, y preparaciones enriquecidas en linfocitos B de donantes sanos.

Condiciones experimentales y clínicas

Las condiciones experimentales y clínicas del tratamiento de los pacientes, incluidos distintos tipos de tratamiento aplicado a sus muestras de sangre, se describen en la tabla 1. La fórmula leucocítica se obtuvo utilizando un contador Coulter y se incluyen en la misma tabla.

Tratamiento de la sangre

Las muestras de sangre, una vez obtenidas, se trataron con anticuerpos monoclonales puros contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR (DAKO) y se dejó que se mezclaran en un rodillo cabeza con cabeza a la temperatura ambiental durante un máximo de 24 horas. Algunas muestras se mezclaron primero en el rodillo cabeza con cabeza durante 15 minutos, después de lo cual se permitió la incubación en un incubador a 22°C. La concentración de los anticuerpos monoclonales añadidos a las muestras de sangre variaron entre 10 y 50 µl/ml de sangre.

Además, se aplicaron otros tratamientos a las mismas concentraciones, y éstos incluyeron la adición de un anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno HLA-DR, un anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de los antígenos de clase I, un anticuerpo monoclonal contra el CD4, un anticuerpo monoclonal contra el CD8, y un anticuerpo monoclonal conjugado a PE contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR.

Otros tratamientos incluyeron la adición simultánea de anticuerpos monoclonales contra las regiones homólogas de las cadenas alfa y beta del antígeno HLA-DR a las muestras de sangre.

Más aún, se añadieron agentes alquilantes tales como la ciclofosfamida a las muestras de sangre en combinación con anticuerpo monoclonal puro contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR.

Después de estos tratamientos, se tiñeron las muestras de sangre con conjuntos de anticuerpos monoclonales marcados tal y como se explica en las instrucciones del fabricante, y luego se analizaron por citometría de flujo.

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

Anticuerpos marcados

Los siguientes anticuerpos monoclonales se utilizaron para detectar los siguientes marcadores sobre las células por 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, control simultest (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 (Betcon & Dickinson and DAKO).

Cada muestra de sangre de un paciente, tanto tratada como sin tratar, se analizó utilizando la mayoría de los anticuerpos del conjunto anterior para explicar los cambios inmunofenotípicos que acompañaron a los diferentes tipos de tratamientos, que se realizaron por separado en diferentes alícuotas de la misma muestra de sangre. Las muestras sin tratar y otros tratamientos de control se tiñeron y analizaron simultáneamente.

Citometría de flujo

La muestra sanguínea completa se tiñó y se lisó según las instrucciones del fabricante. Los análisis por citometría de flujo se realizaron en un FACScan® tanto con simultest o con el software PAINT A GATE (BDIS) que incluye restrosegimiento con controles negativos. Se adquirieron de 10.000 a 20.000 eventos y se almacenaron en ficheros en modo de lista.

Morfología

La morfología se analizó utilizando un microscopio y tinción de Wright.

B. Resultados

Panel CD19 Y CD3

El tratamiento de las muestras de sangre con el anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR siempre disminuyó el número relativo de células CD19⁺. Este marcador es un panantígeno de células B (véase la tabla). Este antígeno está presente en todos los linfocitos B humanos en todas las etapas de maduración, pero se pierde en las células plasmáticas diferenciadas completamente. Por lo tanto, esto es una indicación de que las células B se retrodiferencian en células indiferenciadas.

El mismo tratamiento causa el aumento drástico del número relativo de células CD3⁺, especialmente en la sangre los pacientes con LLC-B, que siempre vino acompañado por un aumento del número relativo de células CD3-CD19. CD3 está presente en todos los linfocitos T maduros y en el 65%-85% de los timocitos. Este marcador siempre se encuentra asociado a los receptores de las células T (TCR) alfa/beta- o gamma/delta, y en conjunto, estos complejos con importantes en la transducción de las señales al interior de la célula. Por lo tanto, se trata de una indicación de que las células B se han retrodiferenciado en células indiferenciadas y luego se han comprometido en nuevas células diferenciadas, denominadas células T.

Un nuevo clon de células apareció en la sangre tratada de los pacientes con LLC-B que coexpresan los marcadores CD19 y CD3, es decir, células CD19⁺ y CD3⁺ (véase el cuadro 1, pacientes 2, 3 y 4 a las 2 h, 6 h y 24 h de comenzar el tratamiento). Otros pacientes con otras afecciones mostraron un aumento del número relativo de estos clones de células. Estas células fueron excepcionalmente grandes y muy granuladas, y se expresaron niveles extremadamente elevados de CD19 en su membrana. El marcador CD3 parece expresarse en estas células a un nivel similar que el expresado en los linfocitos maduros normales.

En la tabla 2, los pacientes número 2, 3 y 4 son realmente números que representan al mismo paciente y su descripción fue solo para mostrar el efecto del tratamiento de la sangre con el tiempo (véase la tabla 1 para la condición experimental y clínica de este paciente).

Los clones CD19⁺CD3⁺ en las muestras tratadas parecieron disminuir con el tiempo, alcanzando los niveles originales, los determinados en las muestras sin tratar a 2 h, 6 h y 24 h.

Otro tipo de célula del mismo tamaño y granulosidad se detectó en las muestras tratadas y estas células tenían elevados niveles de CD19 expresados en su superficie, pero eran negativas para el marcador CD3 y ricas en receptores FC. Sin embargo, el número relativo de estas células descendió con el tiempo. Hay que destacar que a las 24 h de tratamiento de las muestras de sangre (2, 3, y 4) se produjo una disminución del número relativo de células CD19⁺CD3⁻ en un grupo de células que inicialmente se observó que aumentaban después de 2 h y 6 h de tratamiento de las muestras de sangre. Sin embargo, los recuentos Coulter de las poblaciones de leucocitos se redujeron con el tratamiento de la

sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR. Este hallazgo sugiere que este tipo de tratamiento hace aumentar las células atípicas que no se pueden detectar en el Coulter (tabla 1), pero que se pueden contar en la citometría de flujo que cuenta células sobre la base de los marcadores de superficie, tamaño y granulosidad. Es más, estas células atípicas se contaron al analizar la morfología utilizando la tinción de Wrigth al microscopio. Los cuadros de citometría de flujo de estos fenómenos se representan en los cuadros 1, 2, 3 y 4, y los cambios inmunofenotípicos obtenidos por el tratamiento de las muestras de sangre parecen sugerir que los linfocitos CD19⁺ y CD3⁺ son un grupo de células interconectadas, pero que permanecen independientes sobre la base de la expresión relativa de CD19 y CD3 en comparación con las células troncales.

En la tabla 2, los pacientes número 5 y 6 representan al mismo paciente, pero los análisis de la sangre tratada y sin tratar se monitorizaron con el tiempo y a la vez (véase tabla 1).

La sangre de pacientes sin malignidad de células B mostró tendencias similares de cambios inmunofenotípicos cuando se comparó con la sangre de los pacientes con LLC-B, pero los cambios no fueron de igual magnitud. Sin embargo, el número absoluto y relativo de linfocitos B y células positivas para el CMH de clase II en la sangre de estos pacientes es extremadamente bajo en comparación con los encontrados en la sangre de los pacientes con LLC-B.

Dos hermanos, ambos con hipogammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X que eran deficitarios de células B, mostraron cambios inmunofenotípicos diferentes en el número relativo de células CD3⁺ al tratar su sangre. El hermano más joven que tenía dos meses y no estaba enfermo, al tratar su sangre, mostró un ligero aumento en el número relativo de células CD3⁺ que se acompañó de una disminución del número relativo de células CD3⁺CD19⁻. Por otro lado, el otro hermano que tenía dos años y que estaba muy enfermo y con un número relativamente elevado de células T activadas que expresan los antígenos DR mostró una disminución del número de células CD3⁺ al tratar su sangre. No se utilizaron otros marcadores para medir otros cambios inmunofenotípicos que podrían haberse producido debido a que las muestras de sangre obtenidas de estos dos pacientes eran muy pequeñas (tabla 2. ID 43/BD y 04/BD).

El paciente 91 en la tabla 2 muestra una disminución del número relativo de células CD3⁺ tras el tratamiento de la sangre, que vino acompañado por un aumento del número relativo de células CD3⁺CD19⁻. Sin embargo, al analizar los otros marcadores de superficie tales como CD4 y CD8 (véase la tabla 3), se observó que el paciente tenía un número relativamente elevado de células CD4⁺CD8⁺ en su sangre, y esto se detectó antes del tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR, y estas células doblemente positivas disminuyeron apreciablemente tras el tratamiento de la sangre. Además, cuando se analizaron otros marcadores, el número relativo de células CD3⁺ se vio que estaba alto (véase la tabla 4).

Una preparación enriquecida de linfocitos B obtenida de donantes de sangre sanos, cuando se trataba con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta de los antígenos DR, mostró un aumento drástico del número relativo de células CD3⁺ que siempre estaba acompañado de una disminución en el número relativo de células CD19⁺ y de un aumento del número relativo de células CD19⁻CD3⁻. Análisis adicionales utilizando marcadores tales como CD4 y CD8 mostraron un aumento simultáneo del número relativo de estos marcadores. Sin embargo, una preparación enriquecida de linfocitos T de los mismos donantes de sangre no mostró los mismos cambios cuando se trató con el mismo anticuerpo monoclonal.

Panel CD4 Y CD8

El antígeno CD4 es el receptor del virus de la inmunodeficiencia humana. La molécula CD4 se une al antígeno de clase II del CMH por el dominio B2, una región que es similar a los sitios de unión de CD8 para los antígenos de clase I. La unión de CD4 a los antígenos de clase II potencia la capacidad de respuesta de las células T a los antígenos y, por lo tanto, también la unión de CD8 a los antígenos de clase I. Los antígenos CD8 están presentes en el subconjunto de linfocitos T citotóxicos/supresores humanos así como en un subconjunto de linfocitos citolíticos naturales (NK) y en la mayoría de los timocitos normales. Los antígenos CD4 y CD8 se coexpresan en los timocitos y estas células pierden cualquiera de los marcadores a medida que maduran en linfocitos T.

Al analizar los marcadores CD4 y CD8 (véase más adelante) y a partir de la mayor parte de las muestras de sangre presentadas en la tabla 2, se puede extraer un patrón de tinción que apoya la presencia de un proceso de retrodiferenciación de linfocitos B en células indiferenciadas y la posterior diferenciación en linfocitos T.

Las células CD4⁺CD8⁻, que son células doblemente positivas, siempre aparecen tras el tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta, y estos tipos de células estaban notablemente aumentadas en la sangre de las muestras tratadas de pacientes con LLC-B y que estaban ausentes ambos en las muestras sin tratar (véase la tabla 3 y los cuadros 1, 2, 3 y 4). En los mismos especímenes, el número relativo de células positivas simples tales como células CD8⁺ y CD4⁺, también se advirtió que aumentaban simultáneamente. Además, una disminución en el número relativo de células CD4⁻ y CD8⁻ que, al menos en el caso de los pacientes con LLC-B corresponde con las células B, se observó que cayó drásticamente en las muestras tratadas cuando se comparaban con los especímenes sin tratar, que permanecieron al mismo nivel cuando se midieron con el tiempo. Sin embargo, la medición del número relativo de células CD4⁺CD8⁺ con el tiempo en las muestras tratadas mostró que se produjo un aumento simultáneo del número de células positivas simples con una disminución del número relativo de células doblemente positivas. Este tipo de cambio inmunofenotípico es característico del desarrollo tímico de las

células progenitoras de la estirpe de linfocitos T en el timo (pacientes número 2, 3 y 4). El antígeno CD4 está presente en los subconjuntos de linfocitos T inductores/cooperadores (CD4⁺CD3⁺) y en la mayoría de los timocitos normales. No obstante, este antígeno está presente en baja densidad en la superficie celular de los monocitos y en el citoplasma de los monocitos y macrófagos (CD3⁻CD4⁻).

El número relativo de células con poco CD4⁺ se vio afectado de forma diferente en diferentes muestras de sangre tras el tratamiento. El número relativo de este tipo de células parece no afectarse en las muestras de sangre de pacientes con LLC-B tras el tratamiento cuando se compara con las muestras sin tratar. En los monocitos y en los primeros timocitos se encuentra un nivel de expresión de CD4 igualmente bajo.

El paciente VIH⁺25 en tratamiento mostró un aumento sustancial del número de células doblemente positivas que expresaban simultáneamente CD4 y CD8. Por otro lado, el paciente 91 en tratamiento mostró una disminución de este subtipo de células y la observación de tal fenómeno es dependiente del tiempo. El número relativo de células CD8⁺ se observó que aumentaba en las muestras de sangre sin tratar de los pacientes con LLC-B cuando se medían con el tiempo, mientras que el número relativo de células CD4⁺ y de células con poco CD4⁺ se observó que disminuía en los mismos momentos (tabla 3, pacientes 2, 3, y 4).

Panel DR Y CD3

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

Las muestras tratadas y sin tratar analizadas con este panel mostraron cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos cuando las muestras de sangre se analizaron con los marcadores CD19 y CD3 (véase tabla 2), y estos antígenos, tal y como se mencionó anteriormente, son panmarcadores de células B y T, respectivamente.

El tratamiento de la sangre con anticuerpos monoclonales parece afectar el número relativo de linfocitos B DR⁺ de manera que disminuye la cantidad de células DR⁺. Por el contrario, el número relativo de células CD3⁺ (células T) aumenta significativamente (véase la tabla 4 y el cuadro).

Además, el número relativo de células T activadas aumenta en la mayoría de las muestras de sangre tratadas de los pacientes con LLC-B y estos tipos de células se ven afectados de forma diversa en los pacientes con otras afecciones. Es más, el número relativo de células positivas con mucho DR aparece en cifras significativas en las muestras tratadas de pacientes con LLC-B y un bebé de 6 días con aumento de hemoblastos DR⁺ CD34⁺ en su sangre. Sin embargo, hay que señalar que los hemoblastos que estaban presentes en la sangre del paciente eran negativos para los marcadores de células B y T antes y después del tratamiento, pero se hicieron más positivos para los antígenos de la estirpe mieloide tras el tratamiento. El número relativo de células CD3⁻DR⁻ aumentó en la mayoría de las muestras de sangre tratadas y fue proporcional al aumento del número relativo de células CD3⁺ (células T) y fue inversamente proporcional a la disminución del número relativo de células DR⁺ (células B).

Panel CD56&16 Y CD3

Los marcadores CD56 y CD16 se encuentran en un grupo heterogéneo de células, un subconjunto de linfocitos conocidos generalmente como linfocitos granulares grandes y linfocitos citolíticos naturales (NK). El antígeno CD16 se expresa en prácticamente todos los linfocitos NK en reposo y se expresa débilmente en algunos linfocitos T CD3⁺ de determinados individuos. Este antígeno se encuentra en los granulocitos en poca cantidad y está asociado con los linfocitos que contienen gránulos azulófilos grandes. El antígeno CD16 es el receptor III del Fc de la IgG.

Un número variable de linfocitos CD16⁺ coexpresan tanto el antígeno CD57 como el antígeno CD8 a baja densidad o ambos. En la mayoría de los individuos, prácticamente no hay solapamiento con otros antígenos de linfocitos T, tales como los antígenos CD5, CD4 o CD3. El antígeno CD56 está presente en prácticamente todos los linfocitos NK CD16⁺ activados o en reposo, y estos subconjuntos de células realizan una citotoxicidad que no está restringida al complejo mayor de histocompatibilidad.

La inmunofenotipificación de las muestras de sangre tratadas y sin tratar de los pacientes con LLC-B y con otras afecciones mostraron un aumento del número relativo de células que coexpresan los antígenos CD56 y CD16, que están muy granulados y tienen un tamaño medio (véase la tabla 5 y los cuadros 1, 2, 3 y 4). Estas observaciones también venían acompañadas de un notable aumento del número relativo de células que expresan únicamente el antígeno CD3 (sin la expresión de los marcadores CD56 y CD16) y células que expresan los marcadores CD56&CD16 y CD3 juntos.

En la tabla 5, los pacientes número 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 revela un tratamiento de la sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR parece causar la producción espontánea de células CD56⁺ y CD16⁻, células CD3⁺ y CD56⁺, y células CD16⁺ CD3⁻, y estas observaciones siempre vinieron acompañadas de la desaparición de los marcadores de las células B (CD19, DR, CD56, CD16⁻CD3⁻).

Los siguientes análisis de esta muestra de sangre antes y después del tratamiento mostraron la disminución de los niveles de células CD56⁺ y CD16⁺ con el tiempo y el aumento del nivel de células CD3⁻ con el tiempo.

ES 2 308 774 T3

Las muestras de sangre del paciente 7 con LLC-B no mostraron ningún cambio en el número de células que expresan los antígenos CD56, CD16 y CD3 cuando se compara con los cambios inmunofenotípicos observados en las muestras tratadas y sin tratar, y esto se debe a que se añadió una la cantidad de anticuerpo monoclonal relativamente baja en relación con el número de linfocitos B. Sin embargo, el tratamiento de la muestra de sangre de este paciente en otro momento con la cantidad adecuada de anticuerpo monoclonal mostró aumentos significativos en el número de células CD3⁺, CD56⁺ & CD16⁺ y CD56⁺ y CD16⁺ CD3⁺.

Las muestras de sangre de otros pacientes con otras afecciones mostraron cambios variables en el nivel de estas células y esto parece ser dependiente del número de linfocitos B presentes en la sangre antes del tratamiento, la duración del tratamiento y probablemente el estado clínico de los pacientes.

Panel CD 45 Y CD14

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

El CD14 está presente en el 70% al 93% de los monocitos de sangre periférica normales, del 77% al 90% de los fagocitos del líquido peritoneal o pleural. Este antígeno se expresa débilmente en los granulocitos y no existe en los linfocitos sin estimular, linfocitos T activados por mitógenos, eritrocitos o plaquetas.

El antígeno CD45 representa una familia de proteína tirosina fosfatasa y esta molécula interacciona con estímulos externos (antígenos) y lleva a cabo la transducción de la señal a través de miembros de la familia Scr que conducen a la regulación del crecimiento y la diferenciación celulares.

El acoplamiento a la cadena beta de los antígenos DR en las muestras de sangre tratada, especialmente las obtenidas de pacientes con LLC-B, sugiere que tal tratamiento afecta al nivel de antígenos CD45 en los linfocitos B. Los cambios inmunofenotípicos globales que tienen lugar al estimular la cadena beta del antígeno DR parecen originar dos tipos de células diferentes que se pueden separar sobre la base del nivel de expresión de CD45 y CD14 así como la morfología que se determina mediante la dispersión hacia adelante y la dispersión lateral (tamaño y granulosidad, respectivamente), y estos resultados se presentan en la tabla 6 y los cuadros 1, 2, 3, 4 y 5.

Con el tratamiento, el número relativamente bajo de células CD45 (cuando se compara con las muestras sin tratar) aumenta significativamente al igual que el número relativo de células que coexpresan los antígenos CD45 y CD14. Este tipo de cambios inmunofenotípicos coinciden con una disminución del número relativo de células con mucho CD45 (comparado con las muestras sin tratar). Sin embargo, esta última población de células se puede dividir a su vez sobre la base de la morfología y el nivel de expresión de CD45. Un tipo fue enormemente grande y tenía niveles extremadamente altos del antígeno CD45 cuando se comparó con el resto de las células presentes en los cuadros (véanse los cuadros 1, 2, 3 y 4). Al analizar este panel después del tratamiento con el tiempo (véanse los pacientes 2, 3 y 4 de la tabla y cuadros), el número relativo de células CD45⁺ cayó inicialmente de forma abrupta con el tiempo para dar lugar a células con poco CD45. No obstante, el análisis de la sangre 24 horas después mostró la situación opuesta.

Las muestras 5 y 7 revelan cambios inmunofenotípicos opuestos a los conseguidos con otras muestras obtenidas de otros pacientes con LLC-B porque las muestras se analizaron con el anticuerpo monoclonal en tiempo de incubación más cortos. De hecho, el análisis secuencial de las muestras de sangre después del tratamiento parece mostrar que los cambios inmunofenotípicos medidos en el tiempo X no van a ser los mismos pasado el tiempo X (no es fijo una vez iniciada la inducción). Sin embargo, estos tipos de cambios se deben producir de una forma más rigurosa en el cuerpo, ya que si no se presentaría una inmunopatología. El efecto del tratamiento de las muestras de sangre sin malignidad de células B muestra distintos tipos de cambios en los inmunofenotipos de las células porque los linfocitos B están presentes en poca cantidad. No obstante, el tratamiento de las fracciones enriquecidas en linfocitos B obtenidas de donantes de sangre sanos mostraron cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos con LLC-B con un gran número de linfocitos B.

Panel CD8 Y CD3

El determinante antigénico CD8 interacciona con las moléculas de clase I del CMH, lo que origina un aumento de la adhesión entre los linfocitos T CD8⁺ y las células de destino. Este tipo de interacción potencia la activación de los linfocitos en reposo. El antígeno CD8 se acopla a una proteína tirosina cinasa (p56lck) y, a su vez, el complejo CD8/p56lck puede ser importante para la activación de los linfocitos T.

El tratamiento de las muestras de sangre obtenidas de pacientes con LLC-B con anticuerpo monoclonal contra la cadena B causa un aumento significativo del número relativo de células positivas para CD3CD8 y CD3 (muy probablemente sea CD4CD3), lo que a su vez indica más claramente que las células doblemente positivas generadas al inicio están desarrollándose en linfocitos T maduros. Se trata de un proceso que se puede medir directamente mediante los antígenos CD19 y CR, e indirectamente mediante los antígenos CD8⁺CD3⁺. La valoración en serie de las muestras de sangre del mismo paciente con el tiempo parecen concordar con un proceso que es idéntico al desarrollo de los timocitos (tabla 7, paciente 2, 3, y 4, y cuadro 1).

El número relativo de células CD8⁺ aumenta con el tiempo en las muestras tratadas y sin tratar, pero en mayor grado en las muestras sin tratar. Por otra parte, el número relativo de células CD8⁺CD3⁺ disminuye con el tiempo en las muestras sin tratar. Sin embargo, el número relativo de células CD3⁺ aumenta en las muestras de sangre tratada cuando se mide con el tiempo y estos tipos de células se corresponden bastante bien con las células positivas simples para CD4⁺CD3⁺: una forma más madura de timocitos. Además, ya que estas muestras también fueron inmunofenotipificadas con otros paneles (mencionados anteriormente en las tablas 3, 4, 5 y 6), los cambios globales incriminan claramente a las células B en la generación de los progenitores y la proge de los linfocitos T.

Las muestras de sangre de un paciente con LLC-B (números 2, 3 y 4 y tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) en distintas alícuotas se trataron con nada, anticuerpo monoclonal conjugado a PE contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR y la forma sin conjugar del mismo anticuerpo monoclonal. La comparación del tratamiento conjugado a PE indica claramente que no se produjeron cambios en el número relativo de células positivas para CD3 y los marcadores asociados tales como CD4, que se ha observado en cantidades significativas cuando la misma muestra de sangre se trató con la forma sin conjugar del anticuerpo. No obstante, se detectó un aumento del número de células positivas para CD45 que no expresan el antígeno DR en su superficie cuando se midió con el tiempo (véase la tabla 8). Este hallazgo fue similar al detectado en las muestras sin tratar cuando se inmunofenotipificaron con el tiempo (tabla 6). Es más, el número relativo de células que expresan poco CD45 disminuye con el tiempo, un fenómeno que también se advirtió en las muestras sin tratar (cuando se midió con el tiempo) del mismo paciente (véase el cuadro 1A).

C. Comparación de los efectos de otros anticuerpos monoclonales con diferente especificidad sobre la linfopoyesis T

Panel CD19 Y CD3

El tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpos monoclonales contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno DR y la región homóloga de los antígenos de clase I del CMH disminuyeron el número de células CD3⁺ y aumentó el número de células CD19⁻. El tratamiento de la misma sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR disminuyó la número de células CD19⁺ y aumentó el número de células CD3⁻. El tratamiento con el último anticuerpo monoclonal con ciclofosfamida reveló el mismo efecto (tabla 14, paciente 5/6 con LLC-B a las 2 h de tratamiento).

El análisis posterior de las células CD19⁺ y CD3⁺ en las mismas muestras reveló aumentos adicionales del número relativo de células CD3⁺ sólo en la sangre tratada con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR (tabla 14, paciente 5/6 a las 24 h de iniciar el tratamiento). Sin embargo, el análisis posterior (24 h después, paciente 5/6 tabla 14) de las muestras de sangre tratadas con ciclofosfamida más anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR mostró lo opuesto en el número relativo de células CD19⁺ y CD3⁻ en comparación con lo observado a las 2 h de incubación en exactamente las mismas condiciones.

En general, el tratamiento de las muestras de sangre del mismo paciente con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno DR o el anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno de clase I muestra un aumento del número relativo de células CD19⁻ (panmarcador B) cuando se compara con la muestra sin tratar. El número relativo de células CD19⁻CD3⁻ disminuyó ligeramente en las muestras de sangre tratadas con anticuerpo monoclonal contra la cadena alfa del antígeno DR o tratadas con anticuerpo monoclonal contra los antígenos de clase I (véanse tabla 14 y cuadros 2, 3, y 4). El tratamiento de la muestras de sangre del paciente 09 con anticuerpo monoclonal contra antígenos de clase I aumentó el número relativo de las células CD3⁺ y disminuyó ligeramente el número de células CD19⁺ y CD19⁻CD3⁻. No obstante, el tratamiento de una preparación enriquecida de linfocitos B obtenidos de donantes de sangre sanos con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta o la cadena alfa del antígeno DR mostró unos cambios inmunofenotípicos similares a los obtenidos con el paciente con LLC-B.

El tratamiento de pacientes VIH⁺ y deficientes en IgA con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR aumentó el número relativo de células CD3⁻ y disminuyó el número relativo de células CD19⁻. Sin embargo, el tratamiento de la misma muestra de sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga del antígeno de clase I no produjo el mismo efecto. El tratamiento de las muestras de sangre obtenidas de pacientes (34/BD y 04/BD) con deficiencia de células B mostró cambios inmunofenotípicos variables cuando se trató con anticuerpos monoclonales contra la cadena beta del antígeno DR, antígenos de clase I y antígeno CD4.

Panel CD4 Y CD8

Las muestras de sangre analizadas utilizando el panel CD19 y CD3 (tabla 14) también se inmunofenotipificaron con el panel CD4 y CD8 (tabla 15). Ambos paneles parecen coincidir y se confirman entre sí. La incubación durante dos horas de las muestras de sangre en los pacientes con LLC-B (tabla 15, pacientes 5/6 y 10, cuadros 2, 3 y 4) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR o con su anticuerpo monoclonal más ciclofosfamida aumentó el número relativo de células CD8 y CD4⁻ y de células que coexpresan ambos marcadores. Por otra parte, el tratamiento de las mismas muestras con anticuerpos monoclonales contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno DR o contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno de clase I no produjo los mismos efectos.

La comparación de las tendencias inmunofenotípicas obtenidas a las 2 h y las 24 h de incubación con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR más ciclofosfamida reveló cambios inversos en el número relativo de células positivas para CD4 y CD8 (tabla 15, paciente 5/6 con LLC-B a las 2 h y 24 h), y tales cambios se produjeron en concordancia con los obtenidos cuando la misma muestra de sangre se analizó con el panel CD19 y CD3 (tabla 14, el mismo paciente). Los últimos hallazgos indicaron que la diferenciación posterior es reversible al igual que las células indiferenciadas se pueden diferenciar en linfocitos T o linfocitos B.

Panel DR Y CD3

Los cambios inmunofenotípicos obtenidos con el panel DR y CD3 (tabla 16) confirman los hallazgos obtenidos con el panel CD19 y CD3, y el panel CD8 y CD4 (tablas 14 y 15, y cuadros 2, 3 y 4) que siguieron al tratamiento de las mismas muestras de sangre con anticuerpos monoclonales contra la región homóloga de la parte alfa o beta del antígeno DR o anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR más ciclofosfamida a las dos horas del análisis.

De los resultados, se deduce que el anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR es muy capaz de conducir la producción de células positivas para CD3 a partir de células DR⁺.

Además, tratamientos tales como los implicados en el acoplamiento de la cadena alfa de los antígenos DR o el acoplamiento de la parte beta de la molécula en conjunción con ciclofosfamida (mayor tiempo de incubación) promovieron aumentos del número relativo de células CD19⁺ o DR⁺.

Panel CD56 & 16 Y CD3

El tratamiento de muestras de sangre, especialmente las de pacientes con LLC-B con un número elevado de linfocitos B con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR aumenta el número relativo de células positivas para CD56&16.

En estos pacientes, el número relativo de células CD3⁺ y CD56⁺ y CD16⁺CD3⁻ también aumenta después del tratamiento de las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta, confirmando la observaciones anteriores detectadas con el mismo tratamiento cuando las mismas muestras de sangre se analizan con paneles CD3 y CD19, y DR y CD3.

Panel CD45 Y CD14

Con el panel CD45 y CD14 también se analizaron las muestras de sangre tratadas con anticuerpos monoclonales contra las cadenas alfa o beta del antígeno DR o contra la cadena beta más ciclofosfamida o antígenos de clase I (tabla 18). La definición de poco CD45, mucho CD45 y CD45 medio es arbitraria. El tratamiento de la muestra de sangre 5/6 (a las 2 horas) con anticuerpos monoclonales contra la cadena beta de antígeno DR o con este anticuerpo monoclonal más ciclofosfamida generó células con poco CD45⁺ y aumentó el número relativo de células CD45⁻ medio. Sin embargo, el primer tratamiento aumentó el número relativo de células con mucho CD45⁺ y el último tratamiento disminuyó el número relativo de células CD45⁺ medio, y estos cambios eran dependientes del tiempo.

Las muestras de sangre de los pacientes 5/6 y 10 (LLC-B) en tratamiento con anticuerpo monoclonal contra los antígenos de clase I mostraron una disminución del número relativo de células CD45⁺ medio y se hicieron observaciones similares en las muestras de sangre 09 y VIH⁺ tras el mismo tratamiento cuando se comparó con las muestras sin tratar. El tratamiento de las muestras de sangre de VIH⁺ y IgA/D con anticuerpo monoclonal contra el antígeno de clase I aumentó el número relativo de células con poco CD45⁺ cuando se compararon con muestras sin tratar o muestras tratadas con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno DR. No obstante, las muestras de sangre de estos pacientes mostraron una disminución del número relativo de células con CD45⁺ medio al tratarlas con anticuerpo monoclonal contra las regiones homólogas de la cadena beta del antígeno DR. Las células con CD45⁺ medio aumentaron en las muestras de sangre del paciente IgA/D tras el tratamiento con anticuerpo monoclonal contra el antígeno de clase I. Se detectaron células que eran extremadamente grandes, muy granuladas y que expresaban niveles intensos del antígeno CD45 en las muestras de sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR de los antígenos de clase II del CMH (véanse los cuadros 1, 2, 3, 4 y 5).

Panel CD8 Y CD28

El antígeno CD28 está presente en aproximadamente el 60% al 80% de los linfocitos T (CD3⁺) de la sangre periférica, el 50% d los linfocitos T CD8⁺ y el 5% de los timocitos inmaduros CD3⁻. Durante la maduración de los timocitos, aumenta la expresión del antígeno CD28 desde poca densidad en la mayoría de los timocitos inmaduros CD4⁺CD8⁺ hasta una elevada densidad en prácticamente todos los timocitos maduros CD3⁺, CD4⁺ o CD8⁺. La activación celular aumenta además la densidad del antígeno CD28. La expresión del CD28 también divide los linfocitos CD8⁺ en dos grupos funcionales. Los linfocitos CD8⁺CD28⁺ intervienen en la citotoxicidad específica de aloantígeno, que está restringida por la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La supresión de la proliferación celular está mediada por el subconjunto CD8⁺CD28⁺. El antígeno CD28 es una molécula de adhesión celular y funciona como un ligando para el antígeno B7/BB-1 que está presente en los linfocitos B activados.

El tratamiento de las muestras de sangre de los pacientes (tabla 19, pacientes 5/6 y 8) con LLC-B con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR aumenta el número relativo de células CD8⁺, CD28⁺ y CD8⁺CD28⁺, y otros tipos de tratamiento no lo consiguen.

5 *Panel CD34 Y CD2*

El antígeno CD34 se presenta en las células precursoras hematopoyéticas inmaduras y en todas las células hematopoyéticas formadoras de colonias en la médula ósea, incluidos los progenitores unipotentes (CFU-GM, BFU-E) y pluripotentes (CFU-GEMM, CFU-Mix y CFU-hemoblastos). El CD34 también se expresa en los precursores de las células estromales. Los precursores linfoides B y T con la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT)⁺ en el hueso normal son CD34⁺. El antígeno CD34 está presente en las células mieloides tempranas que expresan el antígeno CD33 pero que carecen de los antígenos CD14 y CD15, y en las células eritroides tempranas que expresan el antígeno CD71 y que expresan débilmente el antígeno CD45. El antígeno CD34 también se encuentra en las células del endotelio capilar y en aproximadamente el 1% de los timocitos humanos. Los linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas de la sangre periférica normal no expresan el antígeno CD34. La densidad del antígeno CD34 es mayor en las células progenitoras hematopoyéticas tempranas y disminuye a medida que las células maduran. El antígeno está ausente en las células hematopoyéticas completamente diferenciadas.

Las células progenitoras CD34⁺ no comprometidas son CD38⁻, DR⁻ y carecen de antígenos específicos de estirpe, tales como CD71, CD33, CD10 y CD5, mientras que las células CD34⁺ que están comprometidas con una estirpe expresan el antígeno CD38 en alta densidad.

La mayoría de las células CD34⁺ expresan recíprocamente tanto el antígeno CD45RO como el CD45RA. Aproximadamente el 60% de las leucemias linfoides B agudas y las leucemias mieloides agudas expresan el antígeno CD34. El antígeno no se expresa en la leucemia linfocítica crónica (estirpe B o T) o los linfomas. El antígeno CD2 está presente en los linfocitos T y es un subconjunto de los linfocitos citolíticos naturales (NK).

Los resultados se muestran en los cuadros 2, 3 y 5.

El análisis de las muestras de sangre de un paciente con LLC-B (tabla 20, paciente 5/6 a las 2 horas) después del tratamiento con anticuerpos monoclonales contra la cadena beta del antígeno DR o la cadena alfa del mismo antígeno revelaron unos aumentos notables del número relativo de CD34⁺ y CD34⁺CD2⁺ después del tratamiento con el primer anticuerpo. Ya que las mismas muestras de sangre se inmunofenotipificaron con los paneles antes mencionados (véanse las tablas 14 a 19) para otros marcadores, el aumento del número relativo de células CD34⁺ y CD34⁺CD2⁺ observado aquí parece coincidir con los aumentos en el número relativo de células positivas simples (SP) CD48⁺CD8⁺, CD8⁺CD3⁺ y CD4⁺CD3⁺. Es más, estos hallazgos que parecen exclusivos del acoplamiento de la cadena beta del antígeno HLA-DR dan apoyo al hecho de que el proceso este originando la linfopoyesis T a través de la regresión de los linfocitos B.

El análisis del mismo tratamiento 24 horas después, las células CD34⁺ parecen haber disminuido sus niveles para dar lugar a un mayor aumento del número relativo de linfocitos T. El proceso de retrodiferenciación que inicialmente dio origen a la linfopoyesis T se puede invertir para dar lugar a linfopoyesis B. El primer fenómeno se observó a las dos horas de incubación con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR más ciclofosfamida, mientras que el último proceso se detectó a las 24 h de incubación con el mismo tratamiento en la misma muestra (cuadro 2).

El tratamiento de las muestras de sangre del paciente VIH⁺ (tabla 20, paciente VIH⁺) con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR aumentó notablemente el número relativo de células CD34⁺ y CD2⁺CD34⁺, y lo mismo produjo el tratamiento de la misma muestra de sangre con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR y el anticuerpo monoclonal contra la cadena alfa del mismo antígeno cuando se añadieron juntas. Sin embargo, el tratamiento de esta muestra de sangre con anticuerpo monoclonal contra la cadena alfa del antígeno HLA-DR no afectó el nivel de células CD34⁺. El tratamiento de las muestras de sangre obtenidas de un bebé de 6 días (BB/ST, tabla 20) en el que en ese momento se analizaba si tenía leucemia y que tenía un número muy elevado de células atípicas (hemoblastos) en su sangre, con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR, o anticuerpo monoclonal contra la cadena alfa del mismo antígeno o ambos anticuerpos monoclonales añadidos juntos, dio lugar a los cambios inmunofenotípicos siguientes.

Al analizar las muestras de sangre sin tratar, el número relativo de células CD34⁺ y DR⁻ aumentó notablemente, y al tratar con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta, el número relativo de células CD34⁺ aumentó aún más, pero se advirtió que descendía al tratar con anticuerpo monoclonal contra la cadena alfa del antígeno HLA-DR o al tratar con anticuerpos monoclonales contra las cadenas alfa y beta de la molécula cuando se añaden juntos. Sin embargo, el último tratamiento aumentó el número relativo de células CD34⁺CD2⁺ y se produjo lo contrario cuando la misma muestra de sangre se trató con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR solo. Al analizar las alícuotas de sangre tratada y sin tratar del mismo paciente 24 horas después, el número relativo de CD34⁺ disminuyó con todos los tratamientos mencionados anteriormente, salvo que se mantuvo a un nivel mucho más elevado con tratamiento con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR. El último tratamiento se continuó para disminuir el número relativo de células CD34⁺CD2⁺ 24 horas más tarde.

Estos resultados indican que el acoplamiento al antígeno HLA-DR a través de la cadena beta promueve la producción de más células CD34⁺ a partir de un reservorio CD2⁺CD34⁺ o a partir de tipos de células más maduros tales como linfocitos B de pacientes con LLC-B, y estos resultados indican que este tipo de tratamiento promueve la retrodiferenciación. Sin embargo, la inmunofenotipificación de las muestras de sangre 24 horas después sugiere que estos tipos de células parecen existir junto a otra estirpe y, en este caso, las células parecen existir, o más bien comprometerse ellas mismas, con la estirpe mieloide, lo que se ha observado al analizar la muestra de sangre tratada con el panel CD7 y CD13&33.

La morfología cambia las características inmunofenotípicas de los linfocitos B de pacientes con LLC-B y fracciones enriquecidas de individuos sanos (utilizando perlas CD19) al tratarlos con anticuerpo monoclonal contra las regiones homólogas de la cadena beta de los antígenos de clase II del CMH. Estas se veían acompañadas de un cambio en la morfología de los linfocitos B. Se observó que los linfocitos B que colonizaban los portaobjetos de cristal en frotis de sangre sin tratar eran sustituidos por granulocitos, monocitos, un gran número de células de aspecto primitivo y hematíes nucleados. No se observaron imágenes de mitosis o muerte celular significativa en los frotis de sangre tratada y sin tratar.

Los resultados de la tabla 20 también demuestran un hallazgo adicional importante en cuanto a que, de acuerdo con el método de la presente invención, es posible preparar una célula indiferenciada mediante la retrodiferenciación de una célula indiferenciada más madura.

D. Imágenes al microscopio

Además de las pruebas antigénicas mencionadas anteriormente, el método de la presente invención se siguió visualmente al microscopio.

A este respecto, la figura 1 es una imagen al microscopio de células B diferenciadas antes del método de la presente invención. La figura 2 es una imagen al microscopio de células indiferenciadas formadas por la retrodiferenciación de las células B de acuerdo con la presente invención, en la que el agente fue un anticuerpo monoclonal contra las regiones homólogas de la cadena beta del antígeno HLA-DR. Las células indiferenciadas son la aglomeración de células teñida de negro. La figura 3 es una imagen al microscopio de las mismas células indiferenciadas, pero a menos aumentos.

Las figuras 1 a 3 demuestran visualmente, por tanto, la retrodiferenciación de las células B en células troncales indiferenciadas mediante el método de la presente invención.

La figura 4 es una imagen al microscopio de células B diferenciadas antes del método de la presente invención. La figura 5 es una imagen al microscopio de las células indiferenciadas formadas por la retrodiferenciación de las células B de acuerdo con la presente invención, en la que el agente utilizado fue un anticuerpo monoclonal contra las regiones homólogas de la cadena beta del antígeno HLA-DR. De nuevo, las células indiferenciadas se encuentran en la aglomeración de células teñida de negro. La figura 6 es una imagen al microscopio de la formación de célula granuladas diferenciadas a partir de las mismas células indiferenciadas de la figura 5.

Las figuras 4 y 6 demuestran visualmente, por lo tanto, la retrodiferenciación de las células B en células troncales indiferenciadas mediante el método de la presente invención seguido por el compromiso de las células indiferenciadas en nuevas células diferenciadas que pertenecen a una estirpe diferente de las células diferenciadas originales.

También se siguió al microscopio la retrodiferenciación de las células T en células troncales indiferenciadas mediante el método de la presente invención seguido del compromiso de las células indiferenciadas en nuevas células diferenciadas que pertenecen a una estirpe diferente de las células originales diferenciadas.

E. Compendio

En pocas palabras, los ejemplos describen experimentos *in vitro* que revelan hallazgos extremadamente interesantes en relación con la ontogenia y el desarrollo de los linfocitos T y B que se pueden utilizar para generar células troncales para alterar la linfohematopoyesis en las muestras de sangre periférica en cuestión de horas.

El tratamiento de las muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) con un número elevado de linfocitos B, con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta de los antígenos de clase II, da lugar a un aumento notable del número relativo de linfocitos T positivos simples (SP) y sus progenitores, que eran doblemente positivos para los marcadores antigénicos timocíticos CD4 y CD8, y que se coexpresaron simultáneamente. Sin embargo, estos fenómenos siempre vinieron acompañados de una disminución significativa del número relativo de linfocitos B. Estas observaciones no se detectaron cuando las mismas muestras de sangre se trataron con anticuerpos monoclonales contra la región homóloga de la cadena alfa de los antígenos de clase II o contra la región homóloga de los antígenos de clase I.

El tratamiento de la sangre completa obtenida de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena B del antígeno HLA-DR pareció dar lugar a la linfopoyesis T. Este suceso estuvo marcado por la aparición de células doblemente positivas que coexpresaban los marcadores CD4 y CD8, la aparición de células que expresaban el CD34 y el aumento simultáneo del número de linfocitos positivos simples CD4⁺ CD3⁺ y CD8⁺ CD3⁺. Además, los cambios inmunofenotípicos que tuvieron lugar en la generación de tales células fueron idénticos a los citados para el desarrollo de los timocitos, especialmente cuando se midió con el tiempo.

Los porcentajes de células doblemente positivas (DP) generadas a las dos horas de incubación de la sangre completa con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR disminuyeron con el tiempo, y estos sucesos estuvieron acompañados de un aumento en los porcentajes de células positivas simples CD4⁺ CD3⁺ y CD8⁺ CD3⁺ simultáneamente y en momentos posteriores también. Las cadenas alfa y beta del TCR también se expresaban en estos tipos de células.

Se observó que los linfocitos B perdían constantemente marcadores tales como CD19, CD21, CD23, IgM y DR, y esto coincidía con la aparición de células CD34⁺ y CD34⁺ CD2⁻, aumento de células CD7⁺, aumento de células CD8⁺ CD28⁻ y CD28⁺, aumento de células CD25⁺, la aparición de células CD10⁻ y CD34⁺ y células CD34⁺ y CD19⁺, aumento de células CD5⁺ y células que expresan poca cantidad del antígeno CD45. Estos cambios se debieron al tratamiento de la sangre con el anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR.

Los cambios inmunofenotípicos asociados con tal tratamiento es coherente con la retrodiferenciación y el compromiso posterior (esto es, recompromiso) de los linfocitos B, porque la mayoría de los leucocitos de la sangre de los pacientes con LLC-B antes del tratamiento eran linfocitos B. Además, los linfocitos B de los pacientes con LLC-B, que se indujo su conversión en linfocitos T siguiendo el tratamiento con ciclofosfamida y anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR, fueron capaces de regresar a linfocitos B tras una incubación prolongada con este tratamiento.

Al analizar las muestras tratadas con anticuerpo monoclonal contra la cadena beta del antígeno HLA-DR con paneles CD16 & 56 y CD3, y CD8 y CD3, el número relativo de células que expresan estos marcadores aumenta estacionariamente en incrementos coherentes con los determinados con los paneles tales como CD19 y CD3, y DR y CD3. El análisis de los sobrenadantes de las muestras tratadas y sin tratar de los pacientes con infección de VIH usando neflometría e inmunoelectroforesis revela un aumento de la cantidad de IgG que indica que las células B deben haber atravesado la etapa de célula plasmática. El aumento del número relativo de las células antes mencionadas también vino acompañado de la aparición de células muy granuladas de tamaño medio que expresan los antígenos CD56&16 en cantidades extremadamente elevadas. Se observaron transitoriamente otras células que eran muy grandes y muy granuladas, y resultaron positivas para CD34 y doblemente positivas para los marcadores CD4 y CD8. También se observaron otras células transitorias que eran grandes y granuladas y positivas para los receptores CD3 y CD19. El CD25, que estaba presente en la mayoría de los linfocitos B, se perdió y se volvió a expresar en los linfocitos T recién formados cuyo número siempre se observó en aumento.

Las células CD28⁺CD8⁻ y CD28⁺ aparecieron después del tratamiento de la sangre completa de los pacientes con LLC-B con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno DR. Estos hallazgos se debieron al tratamiento de la sangre con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR.

La linfopoyesis T generada de esta forma también se observó en la sangre periférica de los donantes de sangre sanos, la sangre del cordón umbilical, la médula ósea, pacientes con diversas infecciones, incluidos individuos con VIH⁺ y SIDA, fracciones enriquecidas para los linfocitos B obtenidas de muestras de sangre de donantes de sangre sanos, pacientes con deficiencia de la IgA y otros pacientes con distintas afecciones. Además, el análisis de los marcadores mieloides en las muestras tratadas de dos pacientes con LLC-B con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR mostró un aumento significativo del número relativo de células que expresaban los marcadores mieloides tales como CD13 y CD33. Estos marcadores se coexpresaban con los antígenos CD56 & 16 o CD7. Sin embargo, en una población diferente de células se observó el número relativo de células CD7⁻ con marcadores de linfocitos T y sin antígenos mieloides. Estas observaciones particulares no se vieron en las muestras sin tratar o en la muestras tratadas con anticuerpos monoclonales contra los antígenos de clase I o la región homóloga de la cadena alfa del antígeno HLA-DR (véanse los cuadros 2 y 3). Estos resultados finales sugieren que los linfocitos B, una vez activados a través de la cadena beta del antígeno HLA-DR, no solo eran capaces de regresar a las células progenitoras de linfocitos T sino también capaces de existir en las estirpes mieloides y eritroides.

Se debe señalar que las células troncales que se producen por el método de la presente invención pueden ser células troncales de cualquier tejido y no se limita necesariamente a las células progenitoras linfohematopoyéticas.

Otras modificaciones de la presente invención serán obvias a los expertos en la técnica

ES 2 308 774 T3

TABLA 1

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LOS PACIENTES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS MUESTRAS DE SANGRE INCLUIDOS LOS RECUENTOS COULTER DE LEUCOCITOS (WBC) DESPUÉS Y ANTES DEL TRATAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES DE SANGRE CON DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES Y OTROS AGENTES

ID DEL PACIENTE	DIAGNÓST.	COND. EXP.	WBC/I X10-9		%LINFOCITOS		#LINF/I 10X-9		AGENTE µl/ml
			A	D	A	D	A	D	
1	LLC-B	12H A 22°C	10	ND	86,1	ND	86,1	ND	ANTI-B 50
2	LLC-B	2H A 22°C	39,1	9,6	74,4	63,3	29,9	6,1	ANTI-B 50
		2H A 22°C	39,1	37,7	74,4	75,1	29,9	28,3	ANTI-B PE 50
3	LCC-B	6H A 22°C	39,5	9,3	71,9	76,2	28,3	6,2	ANTI-B 50
		6H A 22°C	39,5	37,3	71,9	72,5	28,3	27,4	ANTI-B PE 50
4	LLC-B	24H A 22°C	39	9,3	73	66,5	28,4	6,2	ANTI-B 50
		24H A 22°C	39	36,2	73	70,4	28,4	25,5	ANTI-B PE 50
5	LLC-B	2H A 22°C							ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-I 50 ANTI-B & AGENTE TOXICO 25 + 25
6	LLC-B	24 H A 22°C							ANTI-B 50
7	LLC-B	24H A 22°C	170	128	95,4	91,1	16,9	11,6	ANTI-B 10
				178		94,2	16,8		ANTI-I 10
				130		90,4	11,9		ANTI-B & AGENTE TÓXICO 10+20
8	LLC-B	12H A 22°C	16	7	81,9	51,2	14	3,0	ANTI-B 20
9	LLC-B	12H A 22°C	+++	89,5	87	85,1	+++	76,2	ANTI-B 30
				+++		85,4		+++	ANTI-I 30
				+++		89,4			ANTI-4 30
				95,4		84,9		+++	ANTI-I+II+4 10+10+10
10	LLC-B	2H A 22°C	19,3	ND	86	ND	16,7	ND	ANTI-B 30 ANTI-I 30
92	PACIENTE EXTERNO	2H A 22°C	5,4	ND	74,5	ND		ND	ANTI-B 20
87	PACIENTE EXTERNO	2H A 22°C	4,8	ND	59,3	ND		ND	ANTI-B 20
91	PACIENTE EXTERNO	2H A 22°C	4,2	ND	54,0	ND		ND	ANTI-B 20
21	PACIENTE EXTERNO	2H A 22°C	3,9	ND	47,4	ND		ND	ANTI-B 20
34	PACIENTE	2H A 22°C	7,2	ND	20,0	ND		ND	ANTI-B 20

ES 2 308 774 T3

	EXTERNO						
36	LACTANTE CON CMV	4H A 22°C	13,4 ND	7,3 ND	ND	ANTI-B 20	
93	LACTANTE CON VIH ⁺	4H A 22°C	5,6 ND	43,4 ND	ND	ANTI-B 20	
BB/ST	CITOBLAS TOS AL 40% EN SANGRE. EDAD 6 DÍAS	2H A 22°C 24H A 22°C	60,5 ND	20,2 ND	12,2 ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25	
VIH25	SIDA	2H A 22°C	7,5 ND	34,8 ND	2,6 ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25	
43/BD	DEFICIENT E EN CÉLS. B	4H A 22°C				ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20	
0B/BD	DEFICIENT E EN CÉLS. B	4 H A 22°C				ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20	
VIH ⁺	SIDA	6H A 22°C				ANTI-B 20 ANTI-I	
IgA-D	DEFICIENT E EN IgA	6H A 22°C				ANTI-B 20 ANTI-I 20	

COND. EXP.: CONDICIONES EXPERIMENTALES

A: ANTES

D: DESPUÉS

ANTI-B: anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR

ANTI-A: anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno HLA-DR

ANTI-I: anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de los antígenos de clase I

ANTI-AB: adición simultánea de ANTI-A Y ANTI-B

ANTI-4: anticuerpo monoclonal contra el antígeno CD4

ANTI-I-II+4: adición simultánea de ANTI-I, ANTI-B y ANTI-4

Agente citotóxico: ciclofosfamida

µl/ml: microlitro por mililitro

l: litro

ES 2 308 774 T3

TABLA 2

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD19 Y CD3

PACIENTE	% CD19+		% CD3+		% CD19+CD3+		% CD3-CD19-		% CD19+HGCD3 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	1	1	6	27	3	10
7	90	72	2	4	0	2	7	8	0	14
8	62	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										

TABLA 3

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA CADENA B DE LA REGIÓN HOMÓLOGA DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA 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	13,3	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	10,2	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

ES 2 308 774 T3

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	6
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

TABLA 4

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA 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	9,6	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	29,2	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	45,5	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 2 308 774 T3

TABLA 5

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD16+56 Y CD3.

PACIENTE	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	0,5	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	96,4
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	3,9	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	1,8	49,4	53,6

TABLA 6

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD45 Y CD14.

PACIENTE	CD45+H		CD45+L		CD45+CD14+	
	A	D	A	D	A	D
1	90,5	70,1	75	21,9	0,8	3,3
2	35,8	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					

ES 2 308 774 T3

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	5,8	6,7
IgA/D	47,4	59,8	41,9	33,3	5,9	4,1

TABLA 7

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B Y OTRAS AFECCIONES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD8 Y CD3.

PACIENTE	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

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE UN PACIENTE CON LLC-B CON EL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO A PE CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD45 Y CD14.

TIEMPO	DR+CD45+CD14+r	CD45+L	CD45+H
2 H	81,7	8,2	8,2
6 H	80,7	8,1	10,6
24 H	79	1,1	18,4

ES 2 308 774 T3

TABLA 9

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

TABLA 10

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

TABLA 11

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE UN PACIENTE CON LLC-B CON EL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO A PE CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD3 Y DR.				
TIEMPO	DR+	CD3+	CD3+DR+	CD3+DR-
2 H	75	95	4,2	10,9
6 H	74,8	8,8	4,8	10,9
24 H	ND	ND	ND	ND

ES 2 308 774 T3

TABLA 12

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

TABLA 13

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE UN PACIENTE CON LLC-B CON EL TIEMPO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPO MONOCLONAL CONJUGADO A PE CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR MEDIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CD8 Y CD3.				
TIEMPO	CD8+DR+	CD3+	CD8+CD3+&DR+r	CD8-CD3-DR-
2 H	76,2	6,6	6,7	10,6
6 H	76,5	6,2	6,2	10,3

TABLA 14

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON LLC-B ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA SANGRE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA A DEL HLA-DR, LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B DEL HLA-DR, LOS DOS MONOCLONALES JUNTOS, EL MONOCLONAL CONTRA LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LA CADENA B MÁS CICLOFOSFAMIDA Y LA REGIÓN HOMÓLOGA DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I MEDIDA CON EL TIEMPO																									
ID	CD19+						CD3+						CD19+CD3+						CD19-CD3-						
	B	AA	AB	ABC	AI		B	AA	AB	ABC	AI		B	AA	AB	ABC	AI		B	AA	AB	ABC	AI		
5/6 2H	86	91	54	40	89		5	4	16	23	5		1	1	3	2	1		6	4	27	33	5		
24H	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 24H	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		
VIH+																									
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		
B: previo; A: posterior; AB: tras añadir el anticuerpo contra la cadena beta; AA: tras añadir el anticuerpo contra la cadena alfa; ABC: tras añadir el anticuerpo bien contra la cadena alfa o bien contra la beta y ciclofosfamida; AI: tras añadir el anticuerpo contra la clase I																									

ES 2 308 774 T3

TABLA 15

CD8 Y CD4																				
	CD8+					CD4+					CD4+CD8+					CD4-CD8-				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
5/6																				
2H	3	2	14	10	4	2	2	8	8	3	0	0	3	2	1	95	94	74	79	93
24H	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	93	N	92
09																				
24H	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-				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
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																				
24H	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																				
	CD45+&16+					CD3+					CD56+&16+CD3+					CD56- &16-CD3-				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
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																				
24H	42	N	N	N	41	36	N	N	N	38	2	N	N	N	2	20	N	N	N	19

ES 2 308 774 T3

TABLA 18

CD45 Y CD14																				
	CD45+L					CD45+M					CD45+H					CD45+14+				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
5/6																				
2H	0	0	5	10	0	44	43	50	50	32	55	43	50	31	67	1	1	1	2	0
10	0	N	0	N	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62	1	N	1	N	0
2H																				
09																				
24H	2	N	N	N	1	18	N	N	N	16	71	N	N	N	76	7	N	N	N	5
VIH+																				
6H	4	N	3	N	6	63	N	61	N	41	23	N	27	N	40	7	N	7	N	7
IgA/D																				
6H	2	N	2	N	4	40	N	31	N	44	47	N	60	N	44	6	N	4	N	6

TABLA 19

CD8 Y CD28																				
	CD8+					CD28+					CD8+CD28+					CD8-CD28-				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
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-				
ID	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI	B	AA	AB	ABC	AI
5/6																				
2H	N	1	34	N	N	N	6	13	N	N	N	3	30	N	N	N	90	21	N	N
24H	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
24H	N	11	29	11	N	N	13	12	9	N	N	27	9	18	N	N	48	49	61	N

ES 2 308 774 T3

CUADRO 1

Cambios inmunofenotípicos de la muestra de sangre tratada y sin tratar del paciente (2, 3 y 4) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR medidos con el tiempo

5

	SIN	CON	FL1	FL2	TIEMPO
10	NOTHING001	WITH002	CD45	CD14	2H
	N0001	WE002	CD45	CD14	6H
	001001	002002	CD45	CD14	24H
15	NOTHING003	WITH004	CD3	CD19	2H
	N0003	WE004	CD3	CD19	6H
	001003	002004	CD3	CD19	24H
20	NOTHING004	WITH005	CD4	CD8	2H
	N0004	WE005	CD4	CD8	6H
	001004	002005	CD4	CD8	24H
25	NOTHING005	WITH006	CD3	DR	2H
	N0005	WE006	CD3	DR	6H
30	001005	002006	CD3	DR	24H
	NOTHING006	WITH007	CD3	CD56&16	2H
	N0006	WE007	CD3	CD56&16	6H
35	001006	002007	CD3	CD56&16	24H
	N003	W004	CD3	CD8	2H
40	NO007	WE008	CD3	CD8	6H
	001007	002008	CD3	CD8	24H

45

50

55

60

65

ES 2 308 774 T3

CUADRO 1A

Cambios inmunofenotípicos de la muestra de sangre tratada y sin tratar del paciente (2, 3, 4) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR conjugado PE medidos con el tiempo

5				
	ID	FL1	FL2	TIEMPO
10	WL003	CD45	CD14	2H
	WEL003	CD45	CD14	6H
	003003	CD45	CD14	24H
15	WL005	CD3	CD19	2H
	WEL005	CD3	CD19	6H
	003005	CD3	CD19	24H
20	WL006	CD4	CD8	2H
	WEL006	CD4	CD8	6H
	003006	CD4	CD8	24H
25	WL007	CD3	DR	2H
	WEL 007	CD3	DR	6H
30	WL008	CD3	CD56&16	2H
	WEL 008	CD3	CD56&16	6H
	WL005	CD3	CD8	2H
35	WEL009	CD3	CD8	6H

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 774 T3

CUADRO 2

Cambios inmunofenotípicos de la sangre tratada y sin tratar del paciente (1) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR, este anticuerpo y ciclofosfamida, anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena alfa del antígeno HLA-DR y anticuerpo monoclonal contra la región homóloga del antígeno de clase I medidos con el tiempo

10	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
		NA001	CD45	CD14	2H
	A2B001. AB		CD45	CD14	2H
15	A2A AA		CD45	CD14	2H
	DNAA001:ABC		CD45	CD14	2H
	A1001. A1		CD45	CD14	2H
20		NC001	CD3	CD19	2H
	C2B001 AB		CD3	CD19	2H
	C2AG01:AA		CD3	CD19	2H
25	DNAC001.ABC		CD3	CD19	2H
	C1001: AI		CD3	CD19	2H
30	A124H001.AI		CD3	CD19	24H
	A2B24H001 AB		CD3	CD19	24H
	A2A24H001. AA		CD3	CD19	24H
35	A2BX24H001:ABC		CD3	CD19	24H
		ND001	CD4	CD8	2H
	D2B001: AB		CD4	CD8	2H
40	D2A001. AA		CD4	CD8	2H
	DNAD001:ABC		CD4	CD8	2H
	D1001: AI		CD4	CD8	2H
45	D124H001:AI		CD4	CD8	24H
	D2BX24H001:ABC		CD4	CD8	24H
50	02B001: AB		CD4	CD8	24H
	D2A001: AB		CD4	CD8	24H

55

60

65

ES 2 308 774 T3

	E1001: AI	CD3	DR	2H
	E2B001: AB	CD3	DR	2H
5	E2A001. AA	CD3	DR	2H
	F1001: AI	CD3	CD56&16	2H
	F2B001. AB	CD3	CD56&16	2H
10	F2A001: AA	CD3	CD56&16	2H
	G1001. AI	CD28	CD8	2H
	G2A001 AA	CD28	CD8	2H
15	G2B001: AB	CD28	CD8	2H
	H1001 AI	CD7	CD33&13	2H
20	H2A001: AA	CD7	CD33&13	2H
	H2B001: AB	CD7	CD33&13	2H
	I2A001: AA	CD21	CD5	2H
25	I2B001:AB	CD21	CD5	2H
	J2A001: AB	CD34	CD2	2H
	J2B001: AB	CD34	CD2	2H
30	B2A24H001.AA	CD34	CD2	24H
	B2B24H001 AB	CD34	CD2	24H
	B2BX24H001 ABC	CD34	CD2	24H
35	K2B001. AB	CD10	CD25	24H
	K2A001 AA	CD10	CD25	24H
40				
45				
50				
55				
60				
65				

ES 2 308 774 T3

CUADRO 3

Cambios inmunofenotípicos de la sangre tratada y sin tratar del paciente (8) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR

5					
	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
10		AN001	CD45	CD14	2H
	A2001		CD45	CD14	2H
		CN001	CD3	CD19	2H
15	C2001		CD3	CD19	2H
		DN001	CD4	CD8	2H
	D2001		CD4	CD8	2H
20		EN001	CD3	DR	2H
	E2001		CD3	DR	2H
		FN001	CD3	CD56&16	2H
25	F2001		CD3	CD56&16	2H
		GN001	CD28	CD8	2H
30	G2001		CD28	CD8	2H
		HN001	CD7	CD5	2H
	H2001		CD7	CD5	2H
35		IN001	CD13	CD20	2H
	I2001		CD13	CD20	2H
		JN001	CD45RA	CD25	2H
40	C2001		CD45RA	CD25	2H
		KN001	CD57	CD23	2H
45	K2001		CD57	CD23	2H

ES 2 308 774 T3

CUADRO 4

Cambios inmunofenotípicos de la muestra de sangre tratada y sin tratar del paciente (10) con anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta del antígeno HLA-DR y anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de los antígenos de clase I

5					
10	CON	SIN	FL1	FL2	TIEMPO
		CLL0001	CD45	CD14	2H
	CLL1001		CD45	CD14	2H
	CLL2001		CD45	CD14	2H
15		CLL0003	CD3	CD19	2H
	CLL1003		CD3	CD19	2H
20	CLL2003		CD3	CD19	2H
		CLL0004	CD4	CD8	2H
	CLL1004		CD4	CD8	2H
25	CLL2004		CD4	CD8	2H
		CLL005	CD3	DR	2H
	CLL1005		CD3	DR	2H
30	CLL2005		CD3	DR	2H
		CLL006	CD3	CD56&16	2H
	CLL1006		CD3	CD56&16	2H
35	CLL2006		CD3	CD56&16	2H

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para preparar una célula indiferenciada, comprendiendo el método poner en contacto una
5 célula más comprometida que comprende el receptor HLA-DR con un agente que se acopla operativamente al receptor, por medio de lo cual se hace que la células más comprometida se retrodiferencie en una célula indiferenciada CD34⁺, en el que el agente es un anticuerpo monoclonal contra la región homóloga de la cadena beta de HLA-DR.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula más comprometida es
10 a) una CFC de células T, una CFC de células B, una CFC de eosinófilos, una CFC de basófilos, una CFC de células GM, una CFC de megacariocitos, una BFC de eritrocitos, una CFC de eritrocitos, una célula T, una célula B, un eosinófilo, un basófilo, un neutrófilo, un monocito, un megacariocito; o
15 b) un linfocito B, un linfocito T o una célula de la estirpe de monocitos macrófagos; o
c) un linfocito granular grande, un linfocito nulo, o un linfocito citolítico natural, cada uno expresando los receptores de superficie celular CD56 y/o CD16; y/o
20 d) de una muestra de sangre.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la célula más comprometida no es una célula cancerosa.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula indiferenciada se
25 selecciona entre una célula progenitora linfohematopoyética, una célula troncal linfoide y una célula troncal mieloide.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula indiferenciada y/o la célula más comprometida es una célula CHM de clase II⁺.
30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente modula la expresión génica del CMH.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente modula la expresión del CHM de clase II⁺.
35 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente se usa junto con un modificador de la respuesta biológica seleccionado entre un inmunomodulador, un factor de crecimiento, una citocina, un receptor de la superficie celular, una hormona, un ácido nucleico, un antígeno, un péptido y un agente alquilante.
- 40 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el modificador de la respuesta biológica es un agente alquilante.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el agente alquilante es o comprende ciclofosfamida.
- 45 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende adicionalmente el recommitment de la célula indiferenciada en una célula más diferenciada.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la célula más diferenciada es de la misma estirpe que
50 la célula que se ha retrodiferenciado en una célula indiferenciada.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la célula más diferenciada es de una estirpe diferente que la de la célula que se ha retrodiferenciado en una célula indiferenciada.
- 55 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha célula comprometida es una célula indiferenciada, y en el que la célula diferenciada no es capaz de diferenciarse en distintas estirpes.

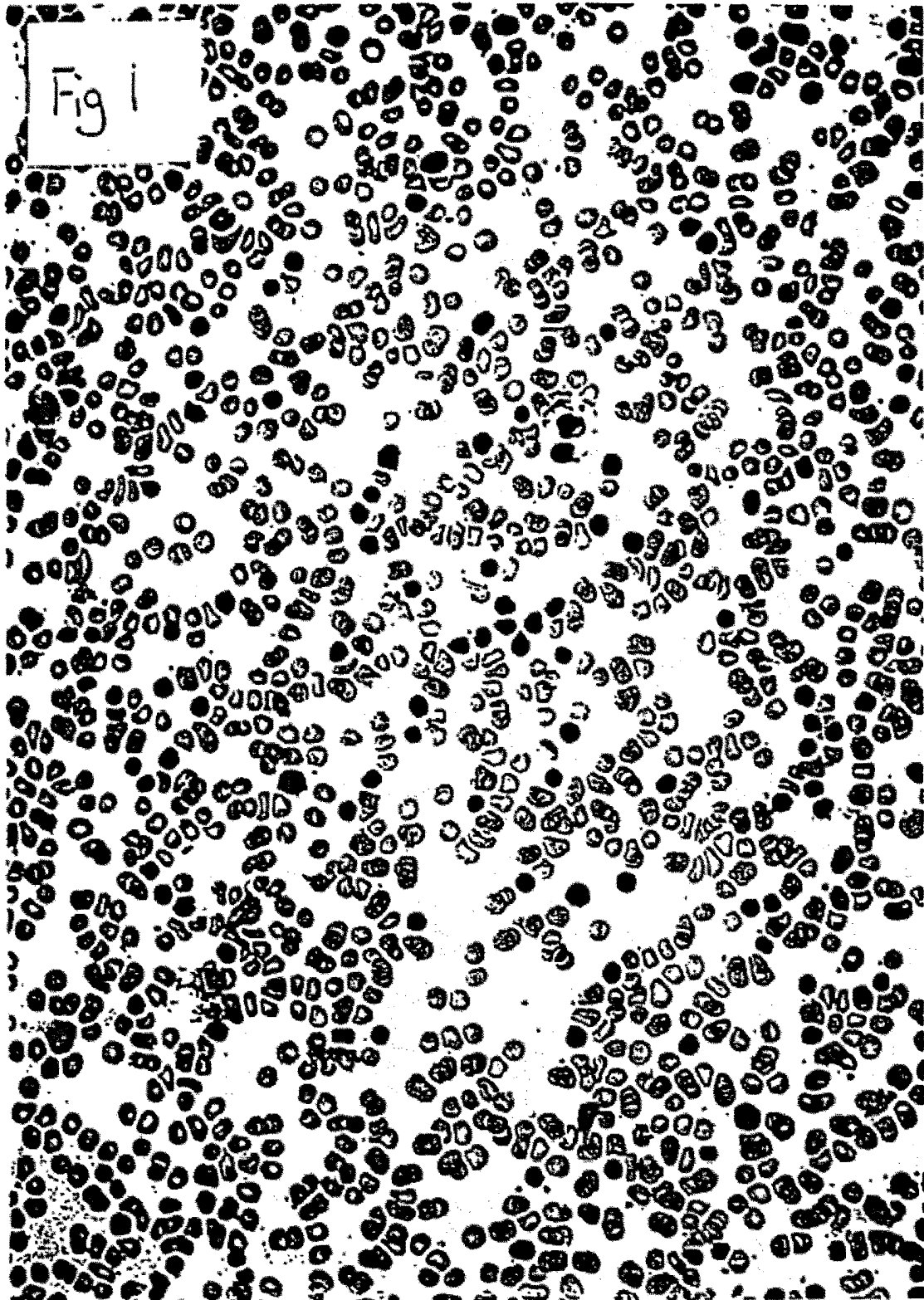


Fig 2

