

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1017973

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1017973

51 Int.Cl.⁷
C12M3/02, C12N5/06, C12M1/36

22 Ingediend: 01.05.2001

30 Voorrang:
10.05.2000 US 09/568254
18.01.2001 GB 0101315
26.02.2001 US 60/271497
21.03.2001 GB 0107093

41 Ingeschreven:
13.11.2001 I.E. 2002/01

47 Dagtekening:
08.11.2002

45 Uitgegeven:
06.01.2003 I.E. 2003/01

73 Octrooihouder(s):
TriStem Trading (Cyprus) Limited te Nicosia,
Cyprus (CY).

72 Uitvinder(s):
Ilham Mohamed Saleh Saeed Abuljadayel te
Londen (GB)

74 Gemachtigde:
Drs. F. Barendregt c.s. te 2280 GE Rijswijk.

54 Inrichting.

57 Een inrichting voor het vormen en/of verhogen van het relatieve aantal ongedifferentieerde cellen in een cel-populatie die toegewijde cellen omvat, welke inrichting omvat een kamer, middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die toegewijde cellen omvat, middelen voor het in de kamer inbrengen van een agens dat teweegbrengt dat de toegewijde cel zich teruggedifferentieert tot een ongedifferentieerde cel, incubatiemiddelen voor het incuberen van het agens en de toegewijde cellen, zodat een toegewijde cel zich teruggedifferentieert tot een ongedifferentieerde cel, meetmiddelen voor het meten van het volume van de celpopulatie, middelen voor het uitvoeren van celtellingen en voor het meten van de celconcentratie van de celpopulatie, en reken-middelen voor het berekenen van het volume van het aan de kamer toe te voegen agens.

NL C 1017973

De inhoud van dit octrooi wijkt af van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en). De oorspronkelijk ingediende stukken kunnen bij het Bureau voor de Industriële Eigendom worden ingezien.

Korte aanduiding: Inrichting.

Gebied van de uitvinding

De uitvinding heeft betrekking op een inrichting. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een inrichting voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel. In het bijzonder, maar niet uitsluitend heeft de uitvinding betrekking op een inrichting voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel uit een meer toegewijde cel. In een volgend aspect heeft de uitvinding eveneens betrekking op een werkwijze voor het vormen van ongedifferentieerde cellen. De inrichting kan eveneens op afstand communiceren met de producent/distributeur/fabrikant/meldkamer/servicecentrum en dergelijke, om bijvoorbeeld op afstand nieuw agens te bestellen en/of om te bevestigen dat bewerkingen correct worden of zijn uitgevoerd. Aldus heeft de uitvinding eveneens betrekking op werkwijzen voor het zaken- doen, waarbij de inrichting en de toepassingen daarvan een rol spelen, bijvoorbeeld het op afstand communiceren met een producent/distributeur/fabrikant/meldkamer/servicecentrum en dergelijke en het antwoorden van de producent/distributeur/fabrikant/meldkamer/servicecentrum op zulke communicaties (bijvoorbeeld het ontvangen en uitvoeren van bestellingen, het ontvangen en/of bewerken en/of antwoorden op gegevens/informatie betreffende bewerkingen en/of de juistheid daarvan).

Achtergrond van de uitvinding

Differentiatie is een proces waarbij structuren en functies van cellen progressief toegewijd raken, waarbij cellen die meer toegewijd zijn worden gevormd, zoals T-cellen of B-cellen uit onrijpe hematopoietische voorlopers. Derhalve raken cellen meer gespecialiseerd wanneer zij meer toegewijd raken. Bij de meerderheid van zoogdierceltypen is celdifferentiatie een eenrichtingsproces dat uiteindelijk leidt tot terminaal gedifferentieerde cellen. Ofschoon er gedurende het leven sommige celtypen bestaan zonder te delen en zonder te worden vervangen, blijven vele celtypes zich echter gedurende de levensduur van het organisme delen en ondergaan deze vernieuwing. Dit kan plaatsvinden door eenvoudige deling (bijv. levercellen) of, zoals in het geval van cellen, zoals hematopoietische cellen en epidermale

cellen, door deling van relatief ongedifferentieerde stamcellen, gevolgd door toewijding van een van de dochtercellen tot een programma van een daaropvolgende onomkeerbare differentiatie. Al deze processen hebben echter één kenmerk gemeen: ofwel cellen behouden hun differentiatietoestand of raken meer gedifferentieerd. Zij raken niet ongedifferentieerd of ook maar minder gedifferentieerd.

Terugdifferentiatie (retrodifferentiatie) is een proces waarbij structuren en functies van cellen progressief worden gewijzigd, waarbij minder gespecialiseerde cellen worden gevormd. Sommige cellen ondergaan van nature een beperkte omgekeerde differentiatie (terugdifferentiatie) *in vivo* als respons op weefselbeschadiging. Men heeft bijvoorbeeld waargenomen dat levercellen gedurende leverregeneratie terugkeren tot een enzymexpressiepatroon dat vergelijkbaar is met het foetale enzympatroon (Curtin en Snell, 1983, Br. J. Cancer, deel 48; 495-505).

In WO96/23870 is getoond dat het mogelijk was gedifferentieerde cellen zodanig te behandelen dat deze ongedifferentieerde cellen werden, waaronder stamcellen. Deze ongedifferentieerde cellen waren in staat te prolifereren en konden hergedifferentieerde nakomelingen van dezelfde lijn of elke andere willekeurige lijn vormen. In het geval van teruggedifferentieerde hematopoietische cellen zijn deze stamcellen pluripotent en kunnen eveneens meer dan een cellijn vormen. De oorspronkelijke bevindingen van WO96/23870 waren volledig onverwacht.

De klinische implicaties van deze vinding zijn enorm. Stamcellen zijn uitermate moeilijk uit menselijke patiënten te verkrijgen. Deze worden typisch verkregen uit umbilicaal weefsel, beenmerg of bloed, waarin deze slechts in zeer kleine hoeveelheden aanwezig zijn. Deze uitvinding verschaft echter een inrichting voor het vormen van stamcellen uit meer toegewijde cellen, in het bijzonder door het terugdifferentiatieproces.

US-6,087,168 beschrijft een werkwijze voor het transdifferentiëren van epidermale cellen tot neuronale cellen, in welke werkwijze epidermale cellen worden gedifferentieerd of teruggedifferentieerd met behulp van een geschikt medium. Zo beschrijven Lake, J.A. *et al.*, Journal of Cell Science, 113, 556-566 (2000) en Rathjen, J. *et al.*, Journal of Cell Science, 112, 601-612 (1999) evenzo de terugdifferentiatie van embryonale stam(ES)-cellen tot vroeg-primitieve ectodermachtige(EPL)-cellen, in respons op twee onderscheidbare factoren.

Samenvatting van de uitvinding

In brede zin wordt een inrichting verschaft voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarin de inrichting middelen omvat om een meer toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel te laten
5 teruggedifferentiëren.

Geen van de documenten uit de stand van de techniek (zoals US-6,087,168, Lake et al. of Rathjen et al.) beschrijft een inrichting die geschikt is voor toepassing bij de bereiding van ongedifferentieerde cellen. Ofschoon de bereiding van ongedifferentieerde cellen
10 door een vakman kan worden uitgevoerd zonder een inrichting volgens de uitvinding toe te passen, blijkt het eindproduct inconsistent te zijn, omdat elke keer wanneer de procedure wordt uitgevoerd de resultaten afhangen van de vaardigheden en de ervaring van de persoon die de procedure uitvoert. Bovendien is de "hands-on"-tijd die nodig is
15 om handmatig ongedifferentieerde cellen te bereiden lang en de bereiding is derhalve voor een laboratorium niet rendabel.

In een specifieke uitvoeringsvorm wordt een inrichting verschaft voor het vormen van en/of het verhogen van het relatieve aantal ongedifferentieerde cellen in een celpopulatie die toegewijde
20 cellen omvat, welke inrichting omvat een kamer, middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die de toegewijde cellen omvat, middelen voor het in de kamer inbrengen van teruggedifferentiatie-middelen die teweeg kunnen brengen dat een toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel teruggedifferentieert, en incubatiemiddelen voor
25 het incuberen van de toegewijde cellen in de aanwezigheid van de teruggedifferentiatiemiddelen, zodanig dat een toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel teruggedifferentieert.

In een andere specifieke uitvoeringsvorm wordt een inrichting verschaft voor het vormen en/of verhogen van het relatieve aantal ongedifferentieerde cellen in een celpopulatie die toegewijde cellen
30 omvat, welke inrichting omvat een kamer, middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die de toegewijde cellen omvat, middelen voor het in de kamer inbrengen van een agens dat teweegbrengt dat een toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel teruggedifferentieert en incubatiemiddelen voor het incuberen van het agens
35 en de toegewijde cellen, zodanig dat een toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel teruggedifferentieert.

Bij voorkeur werkt het agens samen met een receptor die bemiddelt in de invanging, herkenning of presentatie van een antigeen aan

het oppervlak van toegewijde cellen. Met meer voorkeur is de receptor een MHC-klasse I-antigen of een MHC-klasse II-antigen, zoals een klasse I-antigen, gekozen uit menselijke-leukocyt-geassocieerde (HLA)-A-receptor, een HLA-B-receptor, een HLA-C-receptor, een HLA-E-receptor, een HLA-F-receptor of een HLA-G-receptor of een klasse II-antigen, gekozen uit een HLA-DM-receptor, een HLA-DP-receptor, een HLA-DQ-receptor of een HLA-DR-receptor.

Op geschikte wijze kan de receptor een β -keten met homologe gebieden omvatten. Bij voorkeur kan de receptor ten minste een homoloog gebied van de β -keten van HLA-DR omvatten.

Typisch zijn de toegewijde cellen gedifferentieerde cellen. Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen toegewijde hematopoietische cellen, bij voorkeur cellen, gekozen uit T-cel-kolonievormende cellen (CFC-T-cellen), B-cel-kolonievormende cellen (CFC-B-cellen), eosinofiel-kolonievormende cellen (CFC-eosinecellen), basofiel-kolonievormende cellen (CFC-Bas-cellen), granulocyt/monocyt-kolonievormende cellen (CFC-GM-cellen), megakaryocyt-kolonievormende cellen (CFC-MEG-cellen), erythrocyt-barstvormende cellen (BFC-E-cellen), erythrocyt-kolonievormende cellen (CFC-E-cellen), T-cellen en B-cellen.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is de meer toegewijde cel geen kankercel. In een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het agens noch carcinogeen noch in staat tot het bevorderen van kankergroei.

In een voorkeursuitvoeringsvorm is het agens een antilichaam tegen de receptor, zoals een monoklonaal antilichaam tegen de receptor. Specifieke voorbeelden omvatten CR3/43 en het monoklonaal antilichaam TAL.1B5.

In een voorkeursuitvoeringsvorm moduleert het agens de MHC-gen-expressie. Op geschikte wijze kan het agens de expressie van MHC-klasse I⁺- en/of MHC-klasse II⁺ moduleren.

Bij voorkeur wordt het agens toegepast in samenhang met een middel dat de biologische respons wijzigt, zoals een alkyleringsagens, bijvoorbeeld een alkyleringsagens dat cyclofosfoamide is of dit omvat.

Ongedifferentieerde cellen die de voorkeur verdienen omvatten een stamcelantigen. In een voorkeursuitvoeringsvorm zijn de ongedifferentieerde cellen gekozen uit een embryonale stamcel, een pluripotente stamcel, een lymfoïde stamcel, een hematopoietische stamcel, een neuronale stamcel, een epitheliale stamcel, een mesenchymale

stamcel, een endothermale stamcel en een myelöide stamcel. Bij voorkeur worden de ongedifferentieerde cellen gekenmerkt door een of meer van de volgende benoemde oppervlakmerkers: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 en/of CD45-laag. Met meer voorkeur is de ongedifferentieerde cel CD34⁺ en CD38⁻, met nog meer voorkeur CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ en CD45-laag.

Aldus verschaft de uitvinding in een voorkeursuitvoeringsvorm tevens een inrichting voor het verhogen van het relatieve aantal cellen die een benoemde oppervlakmerker CD34⁺ en/of CD38⁻ en/of HLA-DR⁻ en/of CD45-laag en/of CD90 en/of CD117 en/of AC133 hebben, in een celpopulatie die toegewijde cellen omvat, welke inrichting omvat:

- (i) een kamer,
- (ii) middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie, die toegewijde cellen omvat,
- (iii) middelen voor het in de kamer inbrengen van een agens dat werkzaam samenwerkt met de toegewijde cellen; en
- (iv) incubatiemiddelen die de toegewijde cellen, waarmee het agens samenwerkt, werkzaam in de kamer kunnen incuberen, zodat het relatieve aantal CD34⁺- en/of CD38⁻- en/of HLA-DR⁻- en/of CD45-laag- en/of CD90- en/of CD117- en/of AC133-cellen toeneemt als gevolg van genoemde samenwerking.

Een inrichting volgens de uitvinding kan naar wens voorts zuiverings- of isolatiemiddelen omvatten voor het verrijken van de ongedifferentieerde cellen, verwijderen van het agens en/of winnen van de ongedifferentieerde cellen uit de gewijzigde celpopulatie. Bij voorkeur omvatten de zuiveringsmiddelen middelen voor het identificeren van een celoppervlakmerker die aanwezig is op het celoppervlak van de ongedifferentieerde cel of een celoppervlakmerker die aanwezig is op het oppervlak van de toegewijde cel, maar in hoofdzaak afwezig is van het celoppervlak van de ongedifferentieerde cellen. Op geschikte wijze kunnen bij de zuiveringsmiddelen antilichamen worden toegepast die zijn opgewekt tegen bijvoorbeeld de celoppervlakmerker. Voorbeelden van geschikte merkers omvatten CD34, CD45 en HLA-DR. Slechts als voorbeeld is een geschikt zuiveringsmiddel het CliniMACs/Isolex CD34⁺-zuiveringssysteem. In een volgende uitvoeringsvorm van de uit-

vinding kan een dergelijk zuiverings- of isolatiemiddel naar wens als apart middel worden verschaft.

Een inrichting volgens de uitvinding kan naar wens voorts stroomopwaarts negatieve-selectie- en/of celverrijkingsmiddelen omvatten. Als alternatief kan de celpopulatie naar wens voorafgaand aan het inbrengen in de inrichting negatief zijn geselecteerd en/of zijn onderworpen aan celverrijking.

In een andere voorkeursuitvoeringsvorm is de ongedifferentieerde cel volgens de uitvinding CD34⁻ CD45⁻ en negatief voor merkers van hematopoietische lijnen.

De meer gedifferentieerde cellen kunnen van dezelfde lijn zijn als de oorspronkelijke toegewijde cellen of van een andere lijn zijn.

Naast de toepassing voor het vormen van ongedifferentieerde cellen kan een inrichting volgens de uitvinding aldus worden gebruikt om cellen van de ene lijn om te zetten tot die van een andere lijn.

Bijgevolg verschaft de uitvinding in een volgend aspect een inrichting voor het in een celpopulatie die toegewijde hematopoietische cellen omvat, induceren van een hematopoietische lijn waarbij deze cellen van een andere hematopoietische lijn worden, welke inrichting omvat:

- (i) een kamer,
- (ii) middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die toegewijde cellen omvat,
- 25 (iii) middelen voor het in de kamer inbrengen van een middel dat werkzaam samenwerkt met een receptor die bemiddelt in invanging, herkenning of presentatie van een antigeen aan het oppervlak van de toegewijde hematopoietische cellen; en
- (iv) incubatiemiddelen voor het werkzaam in de kamer incuberen van de toegewijde hematopoietische cellen waarmee het
- 30 agens samenwerkt, zodanig dat deze cellen als gevolg van genoemde samenwerking cellen worden van een andere hematopoietische lijn.

35 Bij voorkeur zijn de toegewijde hematopoietische cellen van een B-cel lijn en worden deze cellen van een andere hematopoietische cel lijn, gekozen uit een T-cel lijn en een myeloïdelijn.

Ongedifferentieerde cellen, gevormd door de inrichting volgens de uitvinding kunnen worden gebruikt om een geneesmiddel te bereiden

voor de behandeling van een immunologische stoornis of ziekte. Evenzo kunnen de hertoegewijde cellen die volgens de werkwijzen van de uitvinding zijn gevormd worden gebruikt voor het bereiden van een geneesmiddel voor de behandeling van een immunologische stoornis of
5 ziekte.

De uitvinding heeft grote voordelen, omdat het nu mogelijk is om op eenvoudige wijze ongedifferentieerde cellen te bereiden uit meer toegewijde cellen en om deze ongedifferentieerde cellen te gebruiken als, of voor de bereiding van, geneesmiddelen, ofwel *in vitro*
10 of *in vivo* of combinaties daarvan voor de behandeling van stoornissen.

De uitvinding is eveneens zeer voordelig omdat het mogelijk is de inrichting te gebruiken om de ongedifferentieerde cel, bereid door terugdifferentiatie, toe te wijden tot een toegewijde cel, zoals een
15 nieuwe gedifferentieerde cel, met het oog op het corrigeren of verwijderen van de oorspronkelijk meer toegewijde cel of voor het corrigeren of verwijderen van een product daarvan. Bijvoorbeeld kunnen ongedifferentieerde cellen worden gebruikt om hertoegewijde cellen te vormen, zoals de cellen die de alveoli van de longen bekleden, waar-
20 bij aldus een mechanisme wordt gevormd waardoor beschadigd of ziek longweefsel kan worden vervangen of gerepareerd (zie Le Page, New Scientist, 19 december 2000, blz. 20).

De term "hertoegewijde cel" betekent een cel, afgeleid van een ongedifferentieerde cel - d.w.z. een nieuwe meer toegewijde cel.
25 "Meer toegewijd" betekent meer gedifferentieerd en kan op eenvoudige wijze worden bepaald door verwijzing naar bekende reactieketens en stadia van celdifferentiatie.

De meeste ongedifferentieerde cellen en gedifferentieerde cellen omvatten Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I-antigenen en/of Klasse II-antigenen. Wanneer deze antigenen zijn geassocieerd met deze cellen, worden deze Klasse I⁺- en/of Klasse II-cellen genoemd. Bij voorkeur is de meer toegewijde cel in staat om terug te differentiëren tot een MHC-Klasse I⁺- en/of een MHC-Klasse II⁺-ongedifferentieerde cel.

35 Bij voorkeur is de meer toegewijde cel in staat tot terugdifferentiatie tot een ongedifferentieerde cel die een stamcel-antigen omvat.

Bij voorkeur is de meer toegewijde cel in staat tot terugdifferentiatie tot een CD34⁺-ongedifferentieerde cel.

Bij voorkeur is de meer toegewijde cel in staat tot teruggedifferentiatie tot een lymfohematopoietische voorlopercel.

Bij voorkeur is de meer toegewijde cel in staat tot teruggedifferentiatie tot een pluripotente stamcel.

5 Bij voorkeur vindt de toename plaats binnen 24 uur, bij voorkeur binnen 4 tot 8 uur (zodat welke wijziging dan ook niet slechts kan worden toegeschreven aan celpoliferatie).

Typisch wordt de bepaling van wijzigingen in het aantal ongedifferentieerde cellen uitgevoerd door het volgen van wijzigingen in
10 het aantal cellen die celoppervlakmerkers hebben die kenmerkend zijn voor ongedifferentieerde cellen. Voorbeelden van geschikte celoppervlakmerkers omvatten CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, AC133, CD90 en/of CD45-laag. Als alternatief, of als aanvulling, kunnen afnamen in het aantal cellen die celoppervlakmerkers hebben die typisch zijn voor ge-
15 differentieerde cellen en niet-ongedifferentieerde cellen worden gevolgd.

Op geschikte wijze kan een inrichting volgens de uitvinding naar wens voorts opsporingsmiddelen omvatten voor het volgen van de wijzigingen in het aantal cellen, die celoppervlakmerkers hebben die
20 kenmerkend zijn voor ongedifferentieerde cellen.

Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen die in de test worden gebruikt toegewijde hematopoietische cellen, zoals cellen, gekozen uit CFC-T-cellen, CFC-B-cellen, CFC-eosinecellen, CFC-Bas-cellen, CFC-GM-cellen, CFC-MEG-cellen, BFC-E-cellen, CFC-E-cellen, T-cellen
25 en B-cellen, met meer voorkeur B-cellen.

Bij voorkeur omvat de inrichting volgens de uitvinding voorts een of meer, bij voorkeur twee of meer, met meer voorkeur drie of meer en met nog meer voorkeur vier of meer van de volgende onderdelen:
30

- (i) meetmiddelen voor het meten van het volume van een celpopulatie,
- (ii) telmiddelen (zoals een Coulter-teller, indien noodzakelijk geminiaturiseerd, of een andere geschikte cytometer) voor
35 het uitvoeren van celtellingen om aldus de celconcentratie van een celpopulatie te meten,
- (iii) overdrachtsmiddelen voor het overbrengen van een hoeveelheid (zoals een van te voren bepaalde hoeveelheid) van een celpopulatie uit een opslaghouder naar de kamer, welke

- overdrachtsmiddelen naar wens bijvoorbeeld een pomp kunnen omvatten,
- (iv) rekenmiddelen voor het berekenen van het volume aan de kamer toe te voegen agens, waarbij het volume van het agens afhankelijk is van zowel het volume als de celconcentratie van de celpopulatie,
- (v) aanvullende overdrachtsmiddelen voor het overbrengen van een volume (zoals een berekend volume) van agens naar de kamer, welke aanvullende overdrachtsmiddelen naar wens bijvoorbeeld een injectiespuit kunnen omvatten, die wordt aangedreven door een motor, bijvoorbeeld een stappenmotor,
- (vi) kooldioxidebeheersingsmiddelen (als onderdeel van bijvoorbeeld de incubatiemiddelen) voor het in de kamer beheersen van de kooldioxideconcentratie,
- (vii) temperatuurbeheersingsmiddelen (als onderdeel van bijvoorbeeld de incubatiemiddelen) voor het in de kamer beheersen van de temperatuur,
- (viii) mengmiddelen (als onderdeel van bijvoorbeeld de incubatiemiddelen) voor het mengen van de celpopulatie en het agens binnen de kamer,
- (ix) tijdmeetmiddelen (als onderdeel van bijvoorbeeld de incubatiemiddelen) voor het meten van de incubatieperiode en, naar wens, weergavemiddelen voor het aan de gebruiker weergeven van de resterende tijdsduur en/of alarmmiddelen voor het waarschuwen van de gebruiker betreffend het voltooiën van de incubatieperiode,
- (x) oogstmiddelen voor het uit de kamer oogsten van cellen, in het bijzonder voor het oogsten van de ongedifferentieerde cellen uit de kamer,
- (xi) verwijderingsmiddelen voor het verwijderen van een celpopulatie, die ongedifferentieerde cellen omvat, uit de kamer in een opslaghouder; de verwijderingsmiddelen kunnen bijvoorbeeld een pomp omvatten, en
- (xii) verzegelingsmiddelen voor het verzegelen van een opslaghouder die een celpopulatie omvat, welke celpopulatie ongedifferentieerde cellen omvat.

Op geschikte wijze kunnen in een inrichting volgens de uitvinding de overdrachtsmiddelen (iii) een hoeveelheid (zoals een van te

voren bepaalde hoeveelheid) van een celpopulatie direct uit een patiënt in de kamer (d.w.z. zonder dat een opslaghouder nodig is) overbrengen en/of kunnen de verwijderingsmiddelen (xi) een celpopulatie, die ongedifferentieerde cellen omvat, direct uit de kamer in een patiënt (d.w.z. zonder dat een opslaghouder nodig is) verwijderen.

Op geschikte wijze kunnen de overdrachtsmiddelen (iii) een peristaltische pomp omvatten, welke pomp een celpopulatie uit een opslaghouder via verbindingsmiddelen, bijvoorbeeld een slang, naar de kamer overbrengt. Bij voorkeur gaan de verbindingsmiddelen door een Coulter-teller of een andere geschikte cytometer (zoals is genoemd in (ii)). Op deze wijze kan de concentratie van de celpopulatie gedurende de overdracht van de celpopulatie vanuit de opslaghouder naar de kamer worden berekend.

Bij voorkeur is/zijn de hierboven in (iii) en (xi) genoemde opslaghouder(s) opslagzakken, bij voorkeur wegwerpzakken. Met veel voorkeur is de opslaghouder van (iii) anders dan de opslaghouder van (xi), waarbij eerstgenoemde een invoeropslaghouder is en de laatstgenoemde een uitvoeropslaghouder.

Bij voorkeur omvatten de aanvullende overdrachtsmiddelen (v) een reservoir-agens om te waarborgen dat er voldoende agents op elk geschikt moment beschikbaar is. Wanneer de overdrachtsmiddelen een spuit zijn kan het reservoir zijn voorzien van een aanvullende spuit, zodat wanneer één spuit leeg raakt, de andere spuit het agents begint te leveren.

Bij voorkeur omvatten de kooldioxidebeheersingsmiddelen voor het beheersen van de kooldioxideconcentratie in de kamer een klep, die het inbrengen van een van te voren bepaalde hoeveelheid kooldioxide uit een gascilinder toelaat. De van te voren bepaalde hoeveelheid kooldioxide wordt berekend met het bekende volume lucht in de kamer, de slang en de uitvoeropslaghouder en het gemeten volume van de celpopulatie uit de invoeropslaghouder. Op geschikte wijze wordt de kooldioxide in de kamer ingebracht door een opening die dezelfde is als die waardoor het agents wordt toegevoegd, waardoor de kooldioxide op deze wijze kan worden gebruikt om al het resterende agents in de opening en aanliggende apparatuur te blazen. Naast het bovengenoemde kunnen de kooldioxidebeheersingsmiddelen voorts een opblaasbare luchtblaas omvatten om een aanvullend volume lucht op te nemen die voortvloeit uit het invoeren van aanvullende kooldioxide in het systeem. Als alternatief kan de invoeropslaghouder wanneer deze een-

maal leeg is dienst doen als een luchtblaas. Bij voorkeur wordt kool-dioxide ingebracht voor het vormen van een eindconcentratie van 5% in de kamer.

De temperatuurbeheersingsmiddelen (vii) kunnen op geschikte wijze verwarmingsmiddelen omvatten, welke verwarmingsmiddelen ver-schaft kunnen worden door een warmteplaat die bijvoorbeeld onder de kamer is geplaatst. Het is ook mogelijk dat de verwarmingsmiddelen kunnen worden verschaft door een verwarmde watermantel die naast de kamer of een gedeelte daarvan is geplaatst. Met veel voorkeur wordt
10 de temperatuur in de kamer beheerst tussen ongeveer 25 en ongeveer 37°C.

De mengmiddelen (viii) omvatten bij voorkeur ten minste een peddelarm die langzaam roteert om de celpopulatie en het agens in de kamer te mengen. Als alternatief kan een magnetische roerder worden
15 toegepast. Als ander alternatief kan de kamer mechanisch worden ge-roerd, bijvoorbeeld door voorzichtig te schudden. Een voordeel van het toepassen van mengmiddelen die ten minste een peddelarm omvatten is het feit dat de arm eveneens kan worden ontworpen om dienst te
20 doen als een schraper gedurende het oogsten van de cellen, d.w.z. zo-danig dat wanneer de arm langzaam roteert, de cellen die aan het op-pervlak van de kamer zijn gehecht voorzichtig worden losgemaakt. Met voordeel kunnen de mengmiddelen doelmatig een ronddraaiende beweging bewerkstelligen.

Bij voorkeur omvatten de verwijderingsmiddelen (xi) een peri-staltische pomp. Met voordeel trekken de verwijderingsmiddelen de
25 celpopulatie, die ongedifferentieerde cellen omvat, door een uitlaat-opening bij de bodem van de kamer en in een uitvoeropslaghouder via verbindingsmiddelen, zoals bijvoorbeeld een slang.

Als alternatief voor of in aanvulling op de verwijderingsmidde-len kan een een vrije-ionen-sekwesteermiddel en/of cheleermiddel,
30 bijvoorbeeld een anticoagulans zoals EDTA aan de kamer worden toege-voegd voorafgaand aan het verwijderen van een populatie of cellen daaruit. Het toevoegen van een dergelijk ionen-sekwesteermiddel en/of cheleermiddel aan de kamer veroorzaakt dat de stamcelkoloniën tot een
35 enkele celsuspensie disaggregeren en vergemakkelijkt derhalve de ver-wijdering van cellen uit de kamer met behulp van spoelmiddelen.

De verzegelingsmiddelen (xii) omvatten bij voorkeur een warmte-verzegelinrichting, welke warmteverzegelinrichting de uitvoeropslag-houder afsluit door twee gedeelten van de houder of twee gedeelten

van de verbindingsmiddelen direct voor de houder samen te drukken totdat er een volledige verzegeling heeft plaatsgevonden. Bijvoorbeeld kan de warmteverzegelinrichting leiden tot een verzegelde afsluiting die ongeveer 2 cm breed is, waarna de warmteverzegelinrichting de verzegelde afsluiting langs een middengedeelte daarvan doorsnijdt.

Bij voorkeur is elk gedeelte van de inrichting volgens de uitvinding onafhankelijk te sturen door een centraal computersysteem. Bij voorkeur kan het computersysteem invoersignalen van een gedeelte van de inrichting ontvangen waardoor de computer berekeningen uitvoert op basis van deze invoersignalen en uitvoersignalen uitzendt naar hetzelfde of een ander gedeelte van de inrichting.

De inrichting volgens de uitvinding heeft diverse voordelen, in het bijzonder waarborgt de inrichting dat elke keer wanneer de procedure wordt uitgevoerd een consistent resultaat wordt verkregen en dat er geen verspilling van waardevol agens plaatsvindt. Bovendien kan de inrichting worden geprogrammeerd om de gebruiker te waarschuwen wanneer de terugdifferentiatie is voltooid en/of om de tijd weer te geven die resteert tot voltooiing. Wanneer de inrichting aldus is geprogrammeerd kan de inrichting de gebruiker er op wijzen om nieuw agens aan te schaffen. Dat wil zeggen dat de inrichting het gebruik van het agens en de opgeslagen hoeveelheid kan bewaken en kan aldus de gebruiker wijzen op het feit dat de hoeveelheid opgeslagen agens onder een kritische waarde komt.

De inrichting volgens de uitvinding kan voorts een aantal kamers omvatten, elk voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, toegewijd tot verschillende cellijnen, zoals bijv. spier, haar, neuronen, etc. Aldus kan gelijktijdige bereiding van ongedifferentieerde cellen, toegewijd tot verschillende cellijnen plaatsvinden. Wanneer een aantal kamers wordt toegepast heeft elke kamer bij voorkeur een afzonderlijke uitvoeropening en een afzonderlijke uitvoeropslaghouder.

De cellijn kan in de inrichting volgens de uitvinding worden beheerst door voor de kamer(s) verschillend behandelde kunststoffen toe te passen of door het in elke kamer toevoegen van verschillende chemicaliën.

Bij voorkeur zijn een of meer van de bestanddelen van de inrichting wegwerpbestanddelen. Bijvoorbeeld kunnen een of meer van de volgende bestanddelen wegwerpbestanddelen zijn: de kamer, de invoer-

opslaghouder, de uitvoeropslaghouder, de verbindingsmiddelen die de opslaghouders met de kamer verbinden en de overige overdrachtsmiddelen (v). Op geschikte wijze kunnen de wegwerpbestanddelen worden verschaft als patroon voor plaatsing in de inrichting. Bijvoorbeeld kan
5 een patroon een eerste bloedzak (invoeropslaghouder), een kamer en een tweede (uitvoer-) bloedzak omvatten, waarin de kamer aan beide eerste en tweede bloedzakken is verbonden met behulp van slangen (verbindingsmiddelen). Op geschikte wijze kan de inrichting worden beschouwd als een systeem dat voor een gedeelte uit apparatuur en
10 voor een gedeelte uit wegwerpbestanddelen bestaat.

Bij voorkeur zijn de kamer en/of andere bestanddelen die in contact komen met de celpopulatie geformuleerd van USP-klasse VI-materiaal, polycarbonaatschijven of andere kunststoffen die geen andere vormen van transformanten van de cellen veroorzaken.

15 Bij voorkeur is de celpopulatie die toegewijde cellen omvat bloed. Bij voorkeur is het agens een antilichaam.

In een volgend aspect verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werkwijze omvat het terugdifferentiëren van een meer toegewijde cel tot
20 een ongedifferentieerde cel, waarin de terugdifferentiatie van de meer toegewijde cel plaatsvindt bij een meer toegewijde cel in of uit een buffy-coat-bloedmonster.

In nog een ander aspect verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werkwijze omvat het in contact brengen van een meer toegewijde cel in of
25 van een buffy-coat-bloedmengsel, met een agens dat teweegbrengt dat de meer toegewijde cel terugdifferentieert tot een ongedifferentieerde cel.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is de meer
30 toegewijde cel geen kankercel. In een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het agens noch carcinogeen noch in staat tot het bevorderen van kankergroei.

Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen gedifferentieerd. Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen toegewijde hematopoietische cellen, zoals cellen, gekozen uit CFC-T-cellen, CFC-B-cellen, CFC-eosinocellen, CFC-Bas-cellen, CFC-GM-cellen, CFC-MEG-cellen, BFC-E-cellen, CFC-E-cellen, T-cellen en B-cellen, met meer voorkeur B-cellen.

Bij voorkeur zijn de ongedifferentieerde cellen ongedifferentieerde cellen, gekozen uit een pluripotente stamcel, een hematopoie-

tische stamcel, een neuronale stamcel, een epitheliale stamcel, een mesenchymale stamcel en een embryonale stamcel. Bij voorkeur zijn de ongedifferentieerde stamcellen gekenmerkt door een of meer van de volgende benoemde celoppervlakmerkers: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, 5 AC133, CD90 en/of CD45-laag. Met meer voorkeur is de ongedifferentieerde cel CD34⁺ en CD38⁻, met nog meer voorkeur CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻ en CD45-laag.

Op geschikte wijze zijn de ongedifferentieerde cellen MHC-klasse I⁺- en/of MHC-klasse II⁺-cellen.

10 Bij voorkeur werkt het agens samen met een receptor die bemiddelt in invanging, herkenning of presentatie van een antigen aan het oppervlak van de toegewijde cellen. Met meer voorkeur is de receptor een MHC-klasse I-antigen of een MHC-klasse II-antigen, zoals een klasse I-antigen, gekozen uit de menselijke-leukocyt-geassocieerde 15 (HLA)-A-receptor, een HLA-B-receptor, een HLA-C-receptor, een HLA-E-receptor, een HLA-F-receptor of een HLA-G-receptor of een klasse II-antigen, gekozen uit een HLA-DM-receptor, een HLA-DP-receptor, een HLA-DQ-receptor of een HLA-DR-receptor.

Op geschikte wijze kan de receptor een β -keten met homologe gebieden 20 bieden omvatten. In een uitvoeringsvorm kan de receptor ten minste de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR omvatten.

In een voorkeursuitvoeringsvorm is het agens een antilichaam tegen de receptor, zoals een monoklonaal antilichaam tegen de receptor. Specifieke voorbeelden omvatten CR3/43 en monoklonaal anti- 25 lichaam TAL.1B5.

Op geschikte wijze kan het agens de MHC-genexpressie moduleren, bijvoorbeeld de expressie van MHC-klasse I⁺ en/of van MHC-klasse II⁺.

In nog een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding wordt voorzien in een werkwijze voor het verhogen van het relatieve aantal 30 cellen met een benoemde celoppervlakmerker CD34⁺ en/of HLA-DR⁻ en/of CD38⁻ en/of CD117 en/of AC133 en/of CD90 en/of CD45-laag in een buffy-coat-bloedmonster, waarbij de werkwijze omvat het in contact brengen van een meer toegewijde cel in een buffy-coat-bloedmonster met een agens dat werkzaam met de toegewijde cellen samenwerkt, zodat 35 het relatieve aantal CD34⁺- en/of HLA-DR⁻- en/of CD38⁻- en/of CD117- en/of AC133- en/of CD90- en/of CD45-laag-cellen toeneemt als gevolg van genoemde samenwerking.

In nog een volgend aspect verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werk-

wijze omvat het in contact brengen van een of meer gedifferentieerde cellen in een celpopulatie met teruggedifferentiatiemiddelen die de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in de populatie doelmatig kunnen verschuiven, waarbij wordt veroorzaakt dat een of meer
5 van de gedifferentieerde cellen tot (een) ongedifferentieerde cel(len) teruggedifferentiëren.

In nog een aspect verschaft de uitvinding de toepassing van teruggedifferentiatiemiddelen om de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in een celpopulatie te verschuiven om teruggedifferentiatie van een of meer van de gedifferentieerde cellen tot (een) ongedifferentieerde cel(len) te bewerkstelligen.
10

In nog een ander aspect verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werkwijze omvat het teruggedifferentiëren van een gedifferentieerde cel in
15 een celpopulatie tot een ongedifferentieerde cel, waarin de omgeving, met daarin de celpopulatie die een of meer gedifferentieerde cellen omvat wordt gewijzigd van een eerste omgeving tot een tweede omgeving, waarin de vrije-ionenconcentratie van de tweede omgeving doelmatig wordt gewijzigd ten opzichte van de eerste omgeving hetgeen
20 leidt tot het teruggedifferentiëren van een of meer van de gedifferentieerde cellen tot (een) ongedifferentieerde cel(len).

In nog een ander aspect verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werkwijze omvat het in contact brengen van een of meer gedifferentieerde
25 cellen in een celpopulatie met teruggedifferentiatiemiddelen die de verhouding van normale gedifferentieerde cellen kunnen verschuiven, het kweken van de celpopulatie in een ionenvrije of ionen-gesekwesteerde eerste omgeving, en het wijzigen van de eerste omgeving tot een tweede omgeving, waarin de concentratie van ionen die in de
30 tweede omgeving aanwezig zijn doelmatig wordt gewijzigd ten opzichte van die van de eerste omgeving, om aldus teweeg te brengen dat een of meer van de gedifferentieerde cellen teruggedifferentiëren tot (een) ongedifferentieerde cel(len).

Bij voorkeur zijn de teruggedifferentiatiemiddelen elk middel dat
35 verstoring van de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in een celpopulatie verstoort, hetgeen hierna negatieve selectie wordt genoemd, binnen de celpopulatie en aldus een verstoring van de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in een celpopulatie veroorzaakt.

De terugdifferentiatiemiddelen kunnen bijvoorbeeld een of meer van de volgende zijn: een antilichaam (puur en geconjugeerd (d.w.z. gebonden aan gefixeerde en vrije liganden, zoals bijvoorbeeld magnetische, glazen of polystyreenbolletjes); Histopaque, LymphoPrep (Sigma) of elk ander dichtheidsgradiëntenmedium dat wordt gebruikt om cellen op basis van de dichtheid van de cellen te scheiden; of Dextran (dat sedimentatie van bijvoorbeeld rode bloedcellen veroorzaakt). Andere geschikte middelen die celverplaatsing veroorzaken worden beschreven in Vettese-Dadey (The Scientist, 13 sept. 1999, 13(18): 21.

Bij voorkeur is de vrije-ionenconcentratie van de tweede omgeving toegenomen in vergelijking met die van de eerste omgeving.

Met meer voorkeur is de relatieve vrije-ionenconcentratie van de eerste en tweede omgevingen toegenomen, d.w.z. dat de concentratie vrije ionen in de tweede omgeving is toegenomen. Bij voorkeur neemt de relatieve ionenconcentratie voldoende toe om teweeg te brengen dat een of meer van de gedifferentieerde cellen terugdifferentiëren tot (een) ongedifferentieerde cel(len). De overdracht van cellen uit een medium dat 5mM EDTA (een vrije-ionensekwesteermiddel en/of cheleermiddel) bevat naar een volgend medium dat minder of geen EDTA bevat veroorzaakt bijvoorbeeld een toename in de vrije-ionenconcentratie (bijv. calciumionenconcentratie) die voldoende is om terugdifferentiatie te veroorzaken.

Bij voorkeur is het vrije ion een anion.

Bij voorkeur is het vrije ion een groep I- of groep II-metaal.

Bij voorkeur is het anion een calciumion en/of een magnesiumion.

Op geschikte wijze kan de vrije-ionenconcentratie van een omgeving worden gewijzigd door de omgeving te behandelen met een agens dat in staat is de vrije-ionenconcentratie van de omgeving relatief te wijzigen.

Aldus wordt in een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding een werkwijze verschaft voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarbij de werkwijze omvat het terugdifferentiëren van een gedifferentieerde cel in een celpopulatie tot een ongedifferentieerde cel, waarin de omgeving waarin de celpopulatie is opgenomen wordt gewijzigd door het behandelen van een eerste omgeving met een agens dat de vrije-ionenconcentratie van de omgeving relatief kan wijzigen ter verkrijging van een tweede omgeving.

Bijvoorbeeld kan de eerste omgeving worden behandeld met een of meer vrije-ionensekwesteermiddelen, waarvan de aanwezigheid vervolgens wordt verwijderd of verlaagd om aldus te leiden tot een tweede omgeving met een relatief verhoogde vrije-ionenconcentratie, hetgeen
5 aldus leidt tot terugdifferentiatie van een of meer gedifferentieerde cellen in de celpopulatie. Dat wil zeggen dat het sekwesteermiddel kan worden verwijderd of verlaagd door het sekwesteermiddel bijvoorbeeld geheel of gedeeltelijk fysisch/chemisch te verwijderen uit de eerste omgeving of door de celpopulatie over te brengen naar een
10 tweede omgeving zonder een dergelijk vrije-ionensekwesteermiddel of met een vrije-ionensekwesteermiddel bij een lagere concentratie dan in de eerste omgeving.

In elk geval heeft de tweede omgeving een verhoogde vrije-ionenconcentratie ten opzichte van die van de eerste omgeving, waardoor
15 aldus terugdifferentiatie van de een of meer gedifferentieerde cellen in de celpopulatie wordt teweeggebracht.

Als alternatief kan de celpopulatie worden gekweekt in een eerste omgeving die een lage concentratie vrije ionen omvat, of vrij is van vrije ionen, gevolgd door het overbrengen van de celpopulatie
20 naar een tweede omgeving of door de eerste omgeving zodanig aan te passen dat deze een tweede omgeving wordt, welke tweede omgeving ionen omvat of ionen omvat bij een hogere concentratie dan in de eerste omgeving, waardoor aldus terugdifferentiatie van een of meer gedifferentieerde cellen in de celpopulatie wordt teweeggebracht. De hierin
25 gebruikte term "laag" omvat een omgeving met een relatief lage vrije-ionenuitgangskoncentratie ten opzichte van de eindconcentratie van de tweede omgeving.

Aldus verschaft de uitvinding in een voorkeursuitvoeringsvorm eveneens een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde
30 cel, waarbij de werkwijze omvat het terugdifferentiëren van een gedifferentieerde cel in een celpopulatie tot een ongedifferentieerde cel, waarin de omgeving waarin de celpopulatie die een of meer gedifferentieerde cellen omvat is opgenomen wordt gewijzigd van een eerste omgeving die vrij is van of een lage concentratie heeft aan vrije
35 calcium- of magnesiumionen, naar een tweede omgeving die vrije calcium- of magnesiumionen omvat, of vrije calcium- of magnesiumionen bij een hogere concentratie omvat dan in de eerste omgeving, waardoor aldus terugdifferentiatie van een of meer gedifferentieerde cellen in de celpopulatie wordt teweeggebracht.

Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn gelooft men dat wijzigingen in de ionenconcentratie, in het bijzonder toenames in de ionenconcentratie ertoe leidt dat cellen in de celpopulatie tot kolonieën aggregeren (ondergaan bijvoorbeeld homotypische aggregatie), en dat het fysische contact tussen zulke cellen deze ertoe kan bewegen terug te differentiëren.

Bij voorkeur is het sekwesteermiddel een ionenchelermiddel.

Bij voorkeur omvat het sekwesteermiddel zowel een amine- als een carboxylgroep.

10 Bij voorkeur omvat het sekwesteermiddel een aantal $-N(CH_2CO_2H)_n$ groepen, waarin $n=1$ of $n=2$.

Op geschikte wijze kan het sekwesteermiddel worden gekozen uit een of meer van de volgende: EDTA, heparine, EGTA, DTPA, trisodium-citraat en andere vergelijkbare chelermiddelen en/of anticoagulantia.

Op geschikte wijze dient het sekwesteermiddel in een voldoende hoge concentratie te worden toegevoegd, zodat de verwijdering van de aanwezigheid daarvan teruggedifferentiatie veroorzaakt. Typisch is de concentratie van het sekwesteermiddel voldoende om teruggedifferentiatie te veroorzaken wanneer de aanwezigheid die wordt verwijderd meer bedraagt dan of gelijk is aan ongeveer 2mM.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is de toegewijde cel geen kankercel. In een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het agens noch carcinogeen noch in staat kankergroei te bevorderen.

Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen gedifferentieerd. Bij voorkeur zijn de toegewijde cellen toegewijde hematopoietische cellen, zoals cellen, gekozen uit CFC-T-cellen, CFC-B-cellen, CFC-eosinocellen, CFC-Bas-cellen, CFC-GM-cellen, CFC-MEG-cellen, BFC-E-cellen, CFC-E-cellen, T-cellen en B-cellen, met meer voorkeur B-cellen.

Bij voorkeur zijn de ongedifferentieerde cellen ongedifferentieerde cellen, gekozen uit een pluripotente stamcel, een hematopoietische stamcel, een neuronale stamcel, een epitheliale stamcel, een mesenchymale stamcel en een embryonale stamcel. Bij voorkeur zijn de ongedifferentieerde cellen gekenmerkt door een of meer van de volgende benoemde celoppervlakmerkers: $CD34^+$, $HLA-DR^-$, $CD38^-$, $CD117$, $AC133$, $CD90$ en/of $CD45$ -laag. Met meer voorkeur is de ongedifferentieerde cel $CD34^+$ en $CD38^-$, met nog meer voorkeur $CD34^+$, $CD38^-$, $HLA-DR$ en $CD45$ -laag.

Aldus verschaft de uitvinding in nog een voorkeursuitvoerings-
vorm een werkwijze voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel,
waarbij de werkwijze omvat het teruggedifferentiëren van een gediffe-
rentieerde hematopoietische cel in een celpopulatie tot een ongedif-
5 ferentieerde cel, waarin de omgeving waarin de celpopulatie die een
of meer gedifferentieerde hematopoietische cellen omvat is opgenomen
wordt gewijzigd van een eerste omgeving tot een tweede omgeving,
waarin de vrije-ionenconcentratie van de tweede omgeving doelmatig
wordt gewijzigd ten opzichte van die van de eerste omgeving, hetgeen
10 teweegbrengt dat een of meer van de gedifferentieerde hematopoieti-
sche cellen tot (een) ongedifferentieerde cel(len) teruggedifferen-
tieert.

Op geschikte wijze zijn de ongedifferentieerde cellen MHC-
klasse I⁺- en/of MHC-klasse II⁺-cellen.

15 In een uitvoeringsvorm is de celpopulatie die toegewijde cellen
omvat een buffy-coat-bloedmonster of is afkomstig van een buffy-coat-
bloedmonster.

Met voordeel kan de werkwijze volgens de uitvinding worden toe-
gepast om op doelmatige wijze erythroid-voorlopers te kweken voor de
20 vorming van erythrocyten, welke erythrocyten kunnen worden gebruikt
om tekorten in bijvoorbeeld bloedtoedieningen aan te vullen. Op ge-
schikte wijze kan een werkwijze volgens de uitvinding worden toege-
past om megakaryocyten te vormen voor gebruik bij plaatjesvorming.

Om de uitvinding duidelijk te begrijpen en uit te voeren wordt
25 bij wijze van voorbeeld verwezen naar de bijgevoegde tekeningen.

Fig. 1 toont een perspectivisch aanzicht van een inrichting
volgens de uitvinding waarbij het voorpaneel open is, samen met een
inzetstuk dat een gedeelte van de inrichting toont dat uit zijn omge-
ving is verwijderd;

30 fig. 2 toont een perspectivisch aanzicht van de inrichting vol-
gens fig. 1 met gesloten voorpaneel;

fig. 3 toont een foto van bloedcellen;

fig. 4 toont een kaart van de differentiatie van LSCs voor de
vorming van T-cellen en B-cellen;

35 fig. 5 toont een schema van de differentiatie van MSCs waarbij
deze eosinofielen, basofielen, neutrofielen, megakaryocyten, monocy-
ten, erythrocyten, granulocyten, mestcellen, NKs en lymfocyten vor-
men;

fig. 6 toont lymfohematopoïetische voorlopercellen;

fig. 7 toont het verschijnen van CD45⁺ CD14⁺-cellen na behandeling met CR3/43 antilichamen;

fig. 8 toont een microscoopfoto van gedifferentieerde B-cellen;

fig. 9 toont een microscoopfoto van ongedifferentieerde cellen,
5 gevormd door teruggedifferentiatie van B-cellen;

fig. 10 toont een microscoopfoto van dezelfde ongedifferentieerde cellen als in fig. 9, maar bij een kleinere vergroting;

fig. 11 toont een microscoopfoto van gedifferentieerde B-cellen;

10 fig. 12 toont een microscoopfoto van ongedifferentieerde cellen, gevormd door de teruggedifferentiatie van B-cellen;

fig. 13 toont een microscoopfoto van de vorming van gedifferentieerde granulocytcellen uit dezelfde ongedifferentieerde cellen als van fig. 12;

15 fig. 14 toont bij twee vergrotingen microscoopfoto's van een onbehandeld bloedmonster van een BCLL-patiënt;

fig. 15 toont microscoopfoto's van een behandeld bloedmonster;

fig. 16 en 17 tonen microscoopfoto's, in de tijd genomen gedurende de behandeling van bloedmonsters;

20 fig. 18 toont een Southern blot;

fig. 19 toont verdere Southern blots, verkregen door gebruik te maken van perifere bloedcellen uit patiënten met B-CLL;

fig. 20 toont het gebruik van drie agentia voor het verhogen van het relatieve aantal CD34⁺-cellen in een celpopulatie;

25 fig. 21 toont een kolonietest van stamcellen onder toepassing van omgekeerd-helder-veld-microscopie;

fig. 22 toont een hechtende cellaag wanneer deze wordt aanschouwd met omgekeerd-helder-veld-microscopie; en

fig. 23 toont nog twee afbeeldingen van een video die in de
30 tijd is opgenomen gedurende de behandeling van B-cellen met CR3/43-mab.

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

I. Inrichting

35 De inrichting wordt algemeen aangegeven met verwijzingscijfer 1 en omvat een behuizing 2 met een voorpaneel 3, welk paneel 3 kan worden geopend voor het verschaffen van toegang binnen de inrichting 1. Een invoeropslaghouder, namelijk bloedzak 4, hangt aan een dragerhaak

5. De dragerhaak 5 is onderdeel van een elektronische balans (niet getoond) die de invoerbloedzak 4 kan wegen.

De inrichting omvat voorts een kamer 6, welke kamer 6 is verbonden met de invoerbloedzak 4 via slang 7. De slang 7 omvat een
5 doorzichtig venster 8, welk venster in een Coulter-tellerstroomcel 9 is geplaatst. Een peristaltische pomp (niet getoond) kan het bloed vanuit de invoerbloedzak 4 door de Coulter-tellerstroomcel 9 en in de kamer 6 trekken.

Injectiespuiten 10 en 11 bevatten antigen en worden elk aange-
10 dreven door een stappenmotor (niet getoond). De injectiespuiten 10, 11 worden permanent bij 4°C gehouden binnen een afsluitbare geïsoleerde Peltier-"koelkast" 12. Twee injectiespuiten 10, 11 worden verschaft om te waarborgen dat de inrichting altijd voldoende anti-lichaamtoevoer heeft. De steriliteit van de injectiespuiten 10, 11
15 wordt in stand gehouden door zowel antibiotica als wegwerpfilters van 0,2 µm (algemeen weergegeven met verwijzingsnummer 13).

De inrichting omvat voorts een kooldioxide-inlaatopening 14, waardoorheen kooldioxide uit een gascilinder (niet getoond) via slang
15 in kamer 6 stroomt. De injectiespuiten 10, 11 staan eveneens via
20 de slang 15 in vloeistofverbinding met de kamer 6. Een klep 16 stuurt de stroom kooldioxide en antigen door de slang 15. Verwarmingsmiddelen (niet getoond) bevinden zich onder de kamer 6. Binnen de kamer 6 bevindt zich een roteerbare peddel 17, die antilichaam en bloed binnen de kamer 6 kan mengen. Een tijdmeetinrichting (niet getoond) be-
25 waakt een incubatieperiode wanneer het antilichaam en het bloed binnen de kamer 6 verblijven. De resterende tijd voor incubatie kan op het controlepaneeldisplay 18 worden weergegeven.

Een uitvoeropslaghouder, namelijk een uitvoerbloedzak 19 wordt eveneens in de inrichting 1 gehangen en is met kamer 6 via slang 20
30 verbonden. De slang 20 gaat door een warmteverzegelinrichting 21, die de buis 20 en aldus de uitvoerbloedzak 19 kan verzegelen. Een volgende peristaltische pomp (niet getoond) is aanwezig om de inhoud van de kamer 6 in de uitvoerbloedzak te pompen.

De kamer 6, samen met de slangen 7, 20 en de uitvoerbloedzak 19
35 zijn wegwerpartikelen die na elke procedure worden weggegooid.

Bij gebruik legt de gebruiker een uitvoerbloedzak 19, een kamer 6 en slangen 7, 20 in de inrichting. De slang 20 laat men door de warmteverzegelinrichting 21 en de peristaltische pomp gaan. De slang 7 laat men door de andere peristaltische pomp en de Coulter-teller-

stroomcel 9 lopen. De gebruiker brengt eveneens een bloedzak 4 die bloed van een patiënt bevat in en sluit deze op slang 7 aan. Naast het bovenstaande sluit de gebruiker de slang 15 van de kamer 6 aan op het steriele filter 13. De gebruiker sluit vervolgens het voorpaneel 5 13 van de behuizing 2 en start de inrichting 1 met behulp van het toetsenbord 22 van de inrichting.

De inrichting 1 weegt automatisch de invoerbloedzak 4. Het gewicht van de invoerbloedzak 4 wordt automatisch naar een centraal rekensysteem (niet getoond) gestuurd, dat gelegen is binnen de inrichting 1. Van het gewicht van de invoerbloedzak 4 kan het rekensysteem het bloedvolume in de zak 4 berekenen. De peristaltische pomp trekt vervolgens bloed uit de invoerzak 4 door de slang 7. Het bloed stroomt door het transparante venster 8 van de slang 7 en de Coulter-teller 9 bepaalt de concentratie van cellen die door de slang 7 passeren. De Coulter-teller zendt een signaal direct naar het centrale rekensysteem. Het centrale rekensysteem bepaalt uit het berekende volume bloed en de celconcentratie het correcte volume antilichaam dat door een of meer van de injectiespuiten 10, 11 in de kamer 6 moet worden ingespoten. De peristaltische pomp blijft het bloed uit de zak 4 20 4 pompen totdat van het centrale rekensysteem een signaal wordt ontvangen dat de pomp stopt. Het signaal van het centrale rekensysteem wordt gestuurd in respons op een signaal van de Coulter-teller 9 aan het centrale rekensysteem, welk signaal wordt gestuurd wanneer de Coulter-teller 9 waarneemt dat er geen cellen meer door het venster 8 25 passeren.

Het centrale rekensysteem stuurt vervolgens de stappenmotor (niet getoond) die gekoppeld is aan injectiespuiten 10, 11 een signaal, om een of meer van de injectiespuiten 10, 11 in te drukken om via slang 15 het berekende volume antilichaam in kamer 6 af te geven. 30 De inrichting brengt dan optioneel kooldioxide door de kooldioxide-invoeropening 14 in door het openen van de klep 16 (het openen sluitmechanisme van klep 16 is bestuurbaar door het centrale rekensysteem). De hoeveelheid toe te voegen kooldioxide wordt berekend door het centrale rekensysteem, gebaseerd op het bekende volume lucht 35 in de kamer 6, slangen 7, 20 en de uitvoerbloedzak 19 en het berekende bloedvolume uit de invoerbloedzak. De eindconcentratie kooldioxide in kamer 6 wordt op ongeveer 5% gebracht. De kooldioxide wordt in kamer 6 ingebracht door slang 15. De kooldioxide blaast aldus elk in de slang 15 achterblijvend antilichaam door, waardoor gewaarborgd wordt

dat al het afgegeven antilichaam aan kamer 6 wordt afgegeven. Eenmaal leeg doet de invoerbloedzak 4 dienst als een luchtblaas om het aanvullend gasvolume dat wordt gevormd na het invoeren van de kooldioxide, op te nemen.

5 De inrichting kan voorts een verwarming (niet getoond) omvatten, die door het centrale rekensysteem wordt gestuurd, welke verwarming onder kamer 6 is geplaatst en de temperatuur in de kamer 6 beheerst tussen 25 en 37°C. Een thermostaat die met de verwarming is verbonden voorkomt over- of ondermatige verwarming.

10 Het bloed en het antilichaamagens worden vervolgens gedurende een van te voren bepaalde periode in kamer 6 geïncubeerd. Op geschikte wijze overschrijdt de incubatieperiode 24 uur niet en ligt bij voorkeur tussen 4-8 uur. De gekozen tijd dient voldoende te zijn om de teruggedifferentiatiereactie plaats te laten vinden.

15 Gedurende de incubatie roteren de peddelarmen 17 langzaam om mengen van het antilichaam en het bloed te bewerkstelligen.

Na het voltooien van de incubatieperiode blijven de peddelarmen 17 roteren en werken doelmatig als schraperarmen om de cellen die aan het oppervlak van de kamer 6 zijn gehecht los te maken om aldus het
20 oogsten van de cellen te vergemakkelijken. De peristaltische pomp trekt de inhoud van kamer 6 (d.w.z. bloed dat ongedifferentieerde cellen, bijv. stamcellen bevat) van de bodem van de kamer 6 in de uitvoerbloedzak 9. De pomp blijft pompen tot een gemeten bloedvolume (zoals bepaald door de toepassing van een gekalibreerde peristaltische
25 sche pomp) in de uitvoerbloedzak is gekomen.

Uiteindelijk klemmt de warmteverzegelinrichting 21 de slang 20 af en bewerkstelligt dat een lengte van ongeveer 2 cm van de buis 20 wordt verzegeld, waarna verzegelinrichting 21 de slang 20 ongeveer in het midden van de verzegeling doorsnijdt.

30 De inrichting 1 kan vervolgens de gebruiker waarschuwen dat het proces voltooid is.

De gebruiker kan vervolgens de uitvoerbloedzak 19 verwijderen. De kamer 6, samen met slangen 7, 20 en de invoerbloedzak 4 kunnen worden weggeworpen.

35 De uitvoerbloedzak 9 kan, indien noodzakelijk, worden overgebracht naar een zuiveringssysteem, bijvoorbeeld een systeem voor het identificeren van cellen met celoppervlakmarkers die kenmerkend zijn voor ongedifferentieerde cellen, ofschoon morfologische veranderingen eveneens als leidraad kunnen worden toegepast. Het zuiveringssysteem

kan worden gebruikt om antilichaamagens te verwijderen en/of om optioneel de ongedifferentieerde (stam)cellen te verrijken. Een geschikt zuiveringssysteem is het CliniMACs/Isolex-zuiveringssysteem.

5 II. Ongedifferentieerde cellen en gedifferentieerde cellen

Er worden *in vivo* veel ongedifferentieerde en gedifferentieerde cellen aangetroffen en in het algemene vakgebied zijn zeer veel algemene beschrijvingen ervan bekend.

Als voorbeeld, met betrekking tot cellen van de hematopoietische cellijnen, kan onder andere worden verwezen naar Levitt en Mertelsman, 1995 (Hematopoietic Stem Cells, gepubliceerd door Marcel Dekker Inc. - in het bijzonder bladzijden 45-59) en Roitt *et al.* (Immunology, 4e druk, onder redactie van Brostoff en Male, 1996, Publ. Mosby - in het bijzonder Hoofdstuk 10).

15 Een ongedifferentieerde cel is een onrijpe cel die geen rijp gedifferentieerd kenmerk vertoont maar in staat is nakomelingen te verschaffen die dit wel vertonen. Een bekend voorbeeld van een ongedifferentieerde cel is een stamcel.

Stamcellen zijn ongedifferentieerde onrijpe cellen, die in staat zijn tot zelfvernieuwing (onbeperkte deling) en differentiatie (specialisatie). Deze jeugdige cellen komen in een zich ontwikkelend embryo veel voor; hun aantallen nemen echter af bij het voortschrijden van de ontwikkeling. Daarentegen bevat een volwassen organisme een beperkt aantal stamcellen, waarvan de aanwezigheid is beperkt tot
25 bepaalde lichaamscompartimenten.

Algemeen wordt aangenomen dat stamcellen ofwel monopotent, bipotent of pluripotent zijn. Monopotente en bipotente stamcellen zijn meer beperkt wat betreft ontwikkeling en leveren respectievelijk een of twee typen gespecialiseerde cellen. Daarentegen kunnen pluripotente cellen (PSCs) tot veel verschillende celtypen differentiëren, waardoor weefsel (waaruit organen zijn gevormd) kan worden gevormd of in het geval van totipotente stamcellen, het volledige organisme.

Pluripotente stamcellen zijn, in tegenstelling tot monopotente of bipotente stamcellen, in staat tot multilijn-differentiatie, waardoor een weefsel kan worden gevormd dat kan bestaan uit een verzameling cellen van verschillende typen of lijnen.

De hematopoietische stamcel is een voorbeeld van een pluripotente stamcel die wordt aangetroffen onder beenmergcellen en waaruit

alle verschillende bloedcellen (inclusief leukocyten en erythrocyten) kunnen worden gevormd.

Bloed is een vloeibaar weefsel, bestaande uit lymfocyten (Ly), monocyten (Mo), neutrofielen (Ne), Basofielen (Ba), eosinofielen (Eso), plaatjes (Pl) en rode bloedcellen (Rbc) - zie fig. 3. Dit gespecialiseerde weefsel wordt gevormd door differentiatie van hematopoietische stamcellen (Hsc). Algemeen vechten witte bloedcellen (binnen de grote cirkel) tegen infecties, terwijl rode bloedcellen (binnen de kleine cirkel) nutriënten, zuurstof en afvalproducten door het lichaam transporteren.

Eerder werden hematopoietische stamcellen geëxtraheerd door isolatie uit (i) beenmerg, (ii) met groeifactor gemobiliseerd perifere bloed of (iii) navelstrengbloed (placenta). Recentelijk zijn hematopoietische stamcellen bereid uit embryonale stamcellen (ES) die zijn geëxtraheerd uit embryo's die zijn verkregen met de *in vitro* fertilisatietechnieken. Deze ongedifferentieerde cellen zijn in staat tot multilijn-differentiatie en tot reconstitutie van al het lichaamssweefsel, d.w.z. dat deze totipotent zijn.

Bovengenoemde extractiewerkwijzen zijn problematisch, soms gevaarlijk en worden onder bepaalde omstandigheden als onethisch beschouwd, in het bijzonder in het geval van de embryonale-stamcellen-extractiewerkwijze.

Er bestaat een aantal ongedifferentieerde stamcellen van de hematopoietische lijn. Deze omvatten pluripotente stamcellen (PSCs), lymfoïde stamcellen (LSCs) en myeloïde stamcellen (MSCs), gezamenlijk bekend als lymfohematopoietische voorlopercellen (LPCs). LSCs en MSCs worden elk gevormd door de differentiatie van PSCs. Derhalve zijn LSCs en MSCs meer toegewijd dan PSCs.

Voorbeelden van gedifferentieerde cellen van de hematopoietische lijn omvatten T-cellen, B-cellen, eosinofielen, basofielen, neutrofielen, megakaryocyten, monocyten, erythrocyten, granulocyten, mestcellen en lymfocyten.

T-cellen en B-cellen worden gevormd door de differentiatie van LSCs. Derhalve zijn T-cellen en B-cellen meer toegewijd dan LSCs. Meer in detail verloopt de differentiatieketen van LSC -> pro-B-cel of prothymocyt. Pro-B-cel -> pre-B-cel -> rijpe B-cel -> plasmacel. Protymocyt -> gebruikelijke thymocyt -> rijpe thymocyten (helper/-inducerende of cytotoxische/suppressorlijnen) - zie fig. 4.

Eosinofielen, basofielen, neutrofielen, megakaryocyten, monocyt-
ten, erythrocyten, granulocyten, mestcellen, NKs en lymfocyten worden
gevormd door de differentiatie van MSCs. Derhalve zijn elk van deze
cellen meer toegewijd dan MSCs. Meer in detail verloopt de differen-
5 tiatieketen van MSC -> onrijpe megakaryoblast (-> megakaryoblast ->
plaatje) of pro-erythroblast (-> erythroblast -> reticulocyt -> ery-
throcyt) of myelomonocytische stamcel, een bipotente stamcel die dif-
ferentieert tot ofwel een myeloblast (-> promyelocyt -> myelocyt ->
granulocyt) of tot een monoblast (-> promonocyt -> monocyt -> macro-
10 faag) - zie fig. 5.

De differentiatie-reactieketens van de hematopoiese zijn aldus
uitgebreid gekarakteriseerd en de diverse celstadia zijn op eenvoudi-
ge wijze op basis van morfologie en lijn-specifieke celoppervlakmer-
kers (zie hieronder) te identificeren.

15 Andere stamcellen omvatten neuronale stamcellen, multipotente
stamcellen die neuronen, atrocyten en oligodendrocyten kunnen vormen
(Nakafuku en Nakamura, 1995, J. Neurosci. Res., deel 41(2): 153-68;
Anderson, 1994, FASEB. J., deel 8(10): 707-13; Morshead et al., 1994,
Nueron, deel 13(5): 107-82). Skeletspiersatellietcellen zijn een an-
20 der type stamcel, meer specifiek een aparte klasse myogene cellen die
worden gehandhaafd als rustende stamcellen in een volwassene maar
nieuwe spiercellen kunnen vormen wanneer dit nodig is (Bischoff,
1986, Devl. Biol., deel 115(1): 129-39). Andere typen stamcellen zijn
epitheliale stamcellen, een ondergroep van basale cellen, endodermale
25 stamcellen en mesenchymale stamcellen.

Een zeer belangrijk type stamcellen zijn de embryonale stam-
(ES)cellen. Deze cellen zijn uitgebreid onderzocht en gekarakter-
iseerd. Inderdaad worden ES-cellen routinematig gebruikt bij de vor-
ming van transgene dieren. Gebleken is dat ES-cellen zich *in vitro*
30 tot diverse celtypen differentiëren, waaronder lymfoïde voorlopers
(Potocnik et al., 1994, EMBO. J., deel 13(22): 5274-83) en neurale
cellen. US-5,843,780 en US-6,200,806 beschrijven de isolatie van ES-
cellen uit primaten. ES-cellen worden gekenmerkt door een aantal sta-
dium-specifieke merkers, zoals stadium-specifieke embryonale merkers
35 3 en 4 (SSEA-3 en SSEA-4), glyco-eiwitten met hoog molecuulgewicht
TRA-1-60 en TRA-1-81 en alkalische fosfatase (Andrews et al., 1984,
Hybridoma, deel 3: 347-361; Kannagi et al., 1983, EMBO. J., deel 2:
2355-2361; Fox et al., 1984, Dev. Biol., deel 103: 263:266; Ozawa et
al, 1985, Cell. Differ., deel 16: 169-173).

Diverse antigenen zijn geassocieerd met ongedifferentieerde en gedifferentieerde cellen. De term "geassocieerd" betekent hier dat de cellen het (de) respectieve antigen(en) tot expressie brengen, of tot expressie kunnen brengen, of het antigen presenteren, of kunnen worden geïnduceerd om het te presenteren, of het antigen omvatten.

De meeste ongedifferentieerde cellen en gedifferentieerde cellen omvatten Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I-antigenen en/of Klasse II-antigenen. Wanneer deze antigenen met deze cellen zijn geassocieerd, dan worden deze Klasse I⁺- en/of Klasse II⁺-cellen genoemd.

Elk specifiek antigen dat met een ongedifferentieerde cel of een gedifferentieerde cel is geassocieerd kan als merker dienst doen. Derhalve kunnen verschillende celtypen van elkaar worden onderscheiden op basis van hun geassocieerd(e) bepaald(e) antigen(en) of op basis van een bepaalde combinatie van geassocieerde antigenen.

Voorbeelden van deze merker-antigenen omvatten de antigenen CD34, CD19 en CD3. Wanneer deze antigenen aanwezig zijn dan worden deze bepaalde cellen respectievelijk CD34⁺-, CD19⁺- en CD3⁺-cellen genoemd. Wanneer deze antigenen niet aanwezig zijn worden deze cellen respectievelijk CD34⁻-, CD19⁻- en CD3⁻-cellen genoemd.

Meer in detail zijn PSCs CD34⁺ DR⁻ TdT⁻-cellen (andere bruikbare merkers zijn CD38⁻ en CD36⁺). LSCs zijn DR⁺-, CD34⁺- en TdT⁺-cellen (eveneens CD38⁺). MSCs zijn CD34⁺-, DR⁺-, CD13⁺-, CD33⁺-, CD7⁺- en TdT⁺-cellen. B-cellen zijn CD19⁺-, CD21⁺-, CD22⁺- en DR⁺-cellen. T-cellen zijn CD2⁺-, CD3⁺- en ofwel CD4⁺- of CD8⁺-cellen. Onrijpe lymfocyten zijn CD4⁺- en CD8⁺-cellen. Geactiveerde T-cellen zijn DR⁺-cellen. Natuurlijke killerzellen (NKs) zijn CD56⁺- en CD16⁺-cellen. T-lymfocyten zijn CD7⁺-cellen. Leukocyten zijn CD45⁺-cellen. Granulocyten zijn CD13⁺- en CD33⁺-cellen. Monocyt-macrofagaagcellen zijn CD14⁺- en DR⁺-cellen. Aanvullende details worden in fig. 4 en 5 gegeven.

Embryonale stamcellen brengen SSEA-3 en SSEA-4, glyco-eiwitten met hoog molecuulgewicht TRA-1-60 en TRA-1-81 en alkalische fosfatase tot expressie. Zij brengen eveneens SSEA-1 niet tot expressie, waarvan de aanwezigheid een indicator van differentiatie is. Andere merkers zijn voor andere typen stamcellen bekend, zoals Nestin voor neuro-epiteliale stamcellen (J. Neurosci, 1985, deel 5: 3310. Mesenchymale stamcellen zijn positief voor bijvoorbeeld SH2, SH3, CD29,

CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a en CD124 en negatief voor CD34, CD45 en CD14.

Als alternatief, of als aanvulling kunnen vele cellen worden geïdentificeerd op basis van morfologische kenmerken. De identificatie van cellen, onder toepassing van microscopie, optioneel met kleuringstechnieken is een uitermate ver ontwikkelde wetenschapstak die histologie wordt genoemd en de relevante vaardigheden zijn in het vakgebied algemeen aanwezig. Het is duidelijk dat het kleuren van cellen slechts wordt uitgevoerd op celmonsters om de identiteit te bevestigen omdat kleuring in het algemeen celdood tot gevolg heeft.

Door te kijken naar de aanwezigheid van de hierboven genoemde antigeenmerkers is het aldus mogelijk om bepaalde celtypen te identificeren (d.w.z. of een cel al dan niet een ongedifferentieerde cel of een gedifferentieerde cel is) alsmede de specialisatie van het celtype te identificeren (bijv. of de cel een T-cel of een B-cel is).

Ongedifferentieerde cellen kunnen bestanddelen omvatten die een rol spelen bij antigeenpresentatie, invanging of herkenning. Bij voorkeur is de ongedifferentieerde cel een MHC-Klasse I⁺- en/of een MHC-Klasse II⁺-cel.

De meer toegewijde cel kan bestanddelen omvatten die een rol spelen bij antigeenpresentatie, invanging of herkenning. Bij voorkeur is de meer toegewijde cel een MHC-Klasse I⁺- en/of van de MHC-Klasse II⁺-cel.

De meer toegewijde cel is elke willekeurige cel, afgeleid of afleidbaar van een ongedifferentieerde cel. Aldus is in een voorkeursuitvoeringsvorm de meer toegewijde cel tevens een ongedifferentieerde cel. Als voorbeeld kan de meer toegewijde cel derhalve een lymfoïde stamcel of een myeloïde stamcel zijn en is de ongedifferentieerde cel een pluripotente stamcel.

In een andere uitvoeringsvorm is de meer toegewijde cel een gedifferentieerde cel, zoals een CFC-T-cel, een CFC-B-cel, een CFC-eosinecel, een CFC-Bas-cel, een CFC-GM-cel, een CFC-MEG-cel, een BFC-E-cel, een CFC-E-cel, een T-cel, een B-cel, een eosinofiel, een basofiel, een neutrofiel, een monocyt, een megakaryocyt of een erythrocyt; en is de ongedifferentieerde cel een myeloïde stamcel, een lymfoïde stamcel of een pluripotente stamcel.

Wanneer de meer toegewijde cel een gedifferentieerde cel is, dan is de gedifferentieerde cel bij voorkeur een B-lymfocyt (geactiveerd of niet geactiveerd), een T-lymfocyt (geactiveerd of niet geac-

tiveerd), een cel van de macrofaag-monocytlijn, een genucleerde cel die in staat is tot expressie van Klasse I- of Klasse II-antigenen, een cel die kan worden geïnduceerd tot expressie van Klasse I- of Klasse II-antigenen of een geënnucleerde cel (d.w.z. een cel die geen
5 kern bevat - zoals een rode bloedcel).

In alternatieve uitvoeringsvormen is de gedifferentieerde cel gekozen uit een van de groep van cellen, omvattend grote granulaire lymfocyten, nullymfocyten en natuurlijke killercellen, die elk CD56- en/of CD16-celoppervlak-receptoren tot expressie brengen.

10 De gedifferentieerde cel kan zelfs worden gevormd door de nucleatie van een geënnucleerde cel.

III. Agentia

Het agens werkt werkzaam samen met de meer toegewijde cel om
15 deze cel tot een ongedifferentieerde cel terug te differentiëren. In dit opzicht kan het agens voor de teruggedifferentiatie van de meer toegewijde cel tot de ongedifferentieerde cel in directe samenwerking of in indirecte samenwerking met de meer toegewijde cel werken.

Het agens kan intracellulair binnen de meer toegewijde cel wer-
20 ken. Echter werkt het agens bij voorkeur extracellulair van de meer toegewijde cel.

Een voorbeeld voor directe samenwerking vindt plaats wanneer de meer toegewijde cel ten minste een celoppervlak-receptor op zijn celoppervlak heeft, zoals een β -keten met homologe gebieden (gebieden
25 die algemeen worden aangetroffen met dezelfde of een gelijkende sequentie), zoals die welke op B-cellen kunnen worden aangetroffen, en waarin het agens direct met de celoppervlak-receptor samenwerkt. Een ander voorbeeld is wanneer de meer toegewijde cel een celoppervlak-receptor op zijn celoppervlak heeft, zoals een α -keten met homologe
30 gebieden, zoals die, welke kunnen worden aangetroffen op T-cellen, en waarin het agens direct met de celoppervlak-receptor samenwerkt.

Een voorbeeld voor indirecte samenwerking is wanneer de meer toegewijde cel ten minste twee celoppervlak-receptoren op zijn celoppervlak heeft en de samenwerking van het agens met een van de recep-
35 toren bewerkstelligt dat de andere receptor dan de teruggedifferentiatie van de meer toegewijde cel induceert.

Het agens voor de teruggedifferentiatie van de meer toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel kan een chemische verbinding of samenstelling zijn. Bij voorkeur is het agens echter in staat samen

te werken met een celoppervlak-receptor op het oppervlak van de meer toegewijde cel. Aldus werkt het agens in een voorkeursuitvoeringsvorm samen met een receptor die aanwezig is op het oppervlak van de meer toegewijde cel - welke receptor tot expressie kan worden gebracht door de meer toegewijde cel, zoals een receptor die in staat is tot expressie te worden gebracht door de meer toegewijde cel.

Bijvoorbeeld omvatten voorkeursagentia een of meer van cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP), een CD4-molecuul, een CD8-molecuul, de volledige T-cel-receptor of een del daarvan, een ligand (gefixeerd of vrij), een peptide, een T-cel-receptor (TCR), een antilichaam, een kruisreactief antilichaam, een monoklonaal antilichaam of een polyklonaal antilichaam. Groeifactoren kunnen eveneens worden gebruikt, zoals hematopoietische groeifactoren, bijvoorbeeld erythropoietine en granulocyt-monocyt-koloniestimulerende factor (GM-CSF).

Wanneer het agens een antilichaam is, een kruisreactief antilichaam, een monoklonaal antilichaam of een polyklonaal antilichaam, dan is het agens bij voorkeur een of meer van een antilichaam, een kruisreactief antilichaam, een monoklonaal antilichaam of een polyklonaal antilichaam tegen een of meer van: de β -keten van een MHC-klasse II-antigen, de β -keten van een MHC HLA-DR-antigen, de α -keten van een MHC-klasse I- of -klasse II-antigen, de α -keten van HLA-DR-antigen, de α - en de β -keten van MHC-klasse II-antigen of een MHC-klasse I-antigen. Een voorbeeld van een geschikt antilichaam is CR3/43 (geleverd door Dako).

De term "antilichaam" omvat de diverse fragmenten (gevormd door ofwel proteolytische klieving ofwel door recombinante technologie) en derivaten die bindingswerkzaamheid behouden, zoals Fab-, F(ab')₂- en scFv-antilichamen, alsmede mimetica of bioisostera daarvan. Eveneens omvatten antilichamen genetisch gemanipuleerde varianten waarin enkele aminozuursequenties zijn gemodificeerd, bijvoorbeeld door de vervanging van aminozuurresten voor het versterken van de binding, of, wanneer de antilichamen in een ander soort zijn bereid dan het organisme, waarvan men de cellen wenst te behandelen volgens de werkwijze volgens de uitvinding, om de kans op nadelige immunoreacties te verlagen (een voorbeeld hiervan zijn "gehumaniseerde" muizen-monoklonale antilichamen).

Agentia die worden gebruikt om de omzetting van een meer toegewijde cel tot een ongedifferentieerde cel te bewerkstelligen werken bij voorkeur extracellulair van de meer toegewijde cel. In het bij-

zonder verdient het de voorkeur dat de meer toegewijde cel een receptor omvat die ontvankelijk is voor werkzame samenwerking door het agens, en dat het agens werkzaam met de receptor samenwerkt.

De receptor kan bijvoorbeeld een celoppervlak-receptor zijn.

- 5 Specifieke voorbeelden van celoppervlak-receptoren omvatten MHC-klasse I- en -klasse II-receptoren. Bij voorkeur omvat de receptor een α -component en/of een β -component, zoals het geval is voor de MHC-klasse I- en -klasse II-receptoren.

- 10 Met meer voorkeur omvat de receptor een β -keten met homologe gebieden, bijvoorbeeld ten minste de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR.

Als alternatief, of als aanvulling omvat de receptor een α -keten met homologe gebieden, bijvoorbeeld ten minste de homologe gebieden van de α -keten van HLA-DR.

- 15 Bij voorkeur is de receptor een Klasse I- of Klasse II-antigen van het Major Histocompatibility Complex (MHC). In voorkeursuitvoeringsvormen is de celoppervlak-receptor een van: een HLA-DR-receptor, een DM-receptor, een DP-receptor, een DQ-receptor, een HLA-A-receptor, een HLA-B-receptor, een HLA-C-receptor, een HLA-E-receptor, een
20 HLA-F-receptor of een HLA-G-receptor. In uitvoeringsvormen die nu de voorkeur verdienen is de celoppervlak-receptor een HLA-DR-receptor.

Bij voorkeur is het agens een antilichaam tegen de receptor, met meer voorkeur is het agens een monoklonaal antilichaam tegen de receptor.

- 25 Een ander voorkeursvoorbeeld van een agens is een agens dat de MHC-genexpressie moduleert, zoals de expressie van MHC-Klasse I⁺ en/of van de MHC-Klasse II⁺.

- In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt het agens gebruikt met een biologisch respons-modificatiemiddel. Voorbeelden van biologische
30 respons-modificatiemiddelen omvatten een alkyleringsmiddel, een immuunmodulator, een groeifactor, een cytokine, een celoppervlak-receptor, een hormoon, een nucleïnezuur, een nucleotidesequentie, een antigen of een peptide. Een alkyleringsagens dat de voorkeur verdient is of omvat cyclofosfoamide.

- 35 Andere biologische respons-modificatiemiddelen die de voorkeur verdienen omvatten verbindingen die de expressie van MHC-klasse I- en/of van de -klasse II-antigen opwaarts reguleren. In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt hiervan gebruikgemaakt om een agens dat een MHC-receptor bindt doelmatiger te laten werken.

Omdat elk willekeurig celtype tot de expressie van MHC-klasse I- en/of van de -klasse II- kan worden aanzet, verschaft dit een werkwijze voor teruggedifferentiatie van een groot aantal verschillende celtypen, onafhankelijk of deze klasse I- en/of klasse II-MHC-antigenen al dan niet constitutief tot expressie brengen.

IV. Werkwijzen voor teruggedifferentiatie van cellen

In de werkwijzen volgens de uitvinding wordt een celpopulatie die toegewijde cellen omvat in contact gebracht met een agens dat werkzaam samenwerkt met een of meer toegewijde cellen in de populatie. De celpopulatie wordt vervolgens geïncubeerd om de cellen waarmee het agens een werkzame samenwerking is aangegaan het teruggedifferentiatieproces te laten ondergaan, waarbij deze cellen uiteindelijk ongedifferentieerd raken.

Bij voorkeur omvat de contactstap het samenwerken van het agens met een of meer van de volgende: homologe gebieden van de α -keten van klasse I-antigenen, homologe gebieden van de α -keten van klasse II-antigenen, een CD4-celoppervlak-receptor, een CD8-celoppervlak-receptor, homologe gebieden van de β -keten van klasse II-antigenen in de aanwezigheid van lymfocyten, homologe gebieden van de α -keten van klasse I-antigenen in de aanwezigheid van lymfocyten of homologe gebieden van de α -keten van klasse II-antigenen in de aanwezigheid van lymfocyten. Bij voorkeur vindt de contactstap plaats in de aanwezigheid van het biologische respons-modificatiemiddel (zie hierboven).

Typisch is de celpopulatie afkomstig van een biologisch monster, zoals bloed of hieraan verwante weefsels, waaronder beenmerg, neurale weefsel van het centrale zenuwstelsel of het perifere zenuwstelsel, spierweefsel of epidermis en/of dermis weefsel van de huid (bijv. verkregen door orale afschraping). Bij voorkeur is het biologische materiaal van postnatale afkomst. Het verdient de voorkeur volledig bloed of bewerkte producten daarvan, zoals plasma of de buffy-coat te gebruiken, omdat het afnemen daarvan uit subjecten uitgevoerd kan worden met een minimum aan medisch toezicht. Bloedmonsters worden typisch behandeld met anticoagulantia, zoals heparine of citraat. Cellen in het biologische monster kunnen worden behandeld om bepaalde celtypen te verrijken, om bepaalde celtypen te verwijderen of om celtypen van een weefselmassa te dissociëren. Bruikbare werkwijzen voor het zuiveren en scheiden van cellen omvatten centrifugatie (zoals dichtheidsgradiëntcentrifugatie), stroomcytometrie en af-

finiteitschromatografie (zoals de toepassing van magnetische bolletjes die monoklonale antilichamen tegen celoppervlakmerkers omvatten of uitzeven) (zie Vettesse-Dadey, The Scientist (13 sept. 1999, 13 (18): 21). Een Ficoll-Hypaque-scheiding is bijvoorbeeld bruikbaar
5 voor het verwijderen van erythrocyten en granulocyten waarbij mononucleaire cellen, zoals lymfocyten en monocytten achterblijven.

Omdat de cellen in hoofdzaak primaire kweken zijn kan het noodzakelijk zijn de celpopulaties aan te vullen met geschikte nutriënten om de levensvatbaarheid in stand te houden. Geschikte kweekomstandig-
10 heden zijn bij de vakman bekend. Desalniettemin wordt de behandeling van celpopulaties bij voorkeur zo spoedig mogelijk na het verwijderen van biologische monsters uit patiënten begonnen, typisch binnen 12 uur, bij voorkeur binnen 2 tot 4 uur. De levensvatbaarheid van de cellen kan worden gecontroleerd met behulp van algemeen bekende tech-
15 nieken, zoals trypanblauw-uitsluiting.

Celpopulaties worden doorgaans gedurende ten minste 2 uur met een agens geïncubeerd, typisch tussen 2 en 24 uur, bij voorkeur tussen 2 en 12 uur. Incubaties worden typisch bij ongeveer kamertemperatuur uitgevoerd, bijvoorbeeld bij ongeveer 22°C tot ongeveer 37°C,
20 inclusief 33°C. De voortgang van de terugdifferentiatieprocedure kan periodiek worden gecontroleerd door het verwijderen van een kleine hoeveelheid van het monster en door cellen te onderzoeken met behulp van microscopie en/of stroomcytometrie. Als alternatief kan de inrichting volgmiddelen omvatten voor het on-line bewaken van de voort-
25 gang van de terugdifferentiatieprocedure.

Zodra de relatieve aantallen van het gewenste celtype tot een geschikte waarde zijn gestegen, welke waarde laag kan zijn, bijvoorbeeld 0,1% of hoog kan zijn, zoals 5%, kunnen de hieruit voortvloeiende gewijzigde celpopulaties op een aantal wijzen worden ge-
30 bruikt. Met betrekking tot de aantallen gevormde ongedifferentieerde cellen is het belangrijk rekening te houden met het proliferatieve vermogen van stamcellen. Ofschoon onder bepaalde omstandigheden het aantal gevormde stamcellen of andere ongedifferentieerde cellen laag kan schijnen, hebben onderzoeken aangetoond dat slechts 50 pluripo-
35 tente hematopoietische stamcellen een volledig hematopoietisch systeem in een donormuis kan reconstitueren. Aldus is voor therapeutische toepassing de vorming van een groot aantal cellen niet nodig.

Omzetting van meer toegewijde cellen tot ongedifferentieerde cellen kan eveneens *in vivo* worden uitgevoerd door het aan een pa-

tiënt toedienen van het agens, gemengd met een farmaceutische drager of diluens. Het verdient in vele gevallen echter de voorkeur dat terugdifferentiatie *in vitro/ex vivo* wordt uitgevoerd.

Behandelde celpopulaties die *in vitro* worden verkregen kunnen
5 vervolgens met minimale bewerking worden gebruikt. Deze kunnen bijvoorbeeld op eenvoudige wijze worden gecombineerd met een farmaceutisch aanvaardbare drager of diluens en aan een patiënt worden toegediend die behoefte heeft aan stamcellen.

Het kan echter wenselijk zijn om de celpopulatie voor de ongedifferentieerde cellen te verrijken of de cellen uit de celpopulatie te zuiveren. Dit kan op eenvoudige wijze worden uitgevoerd onder toepassing van een aantal werkwijzen (zie Vattese-Dadey - The Scientist, 13 (18): 21 sept. 1999). Een inrichting volgens de uitvinding kan naar wens zuiverings- of isolatiemiddelen omvatten voor het verrijken
15 van de ongedifferentieerde cellen of voor het verwijderen van de ongedifferentieerde cellen uit de gewijzigde celpopulatie. De cellen kunnen bijvoorbeeld worden gezuiverd op basis van celoppervlakmerkers onder toepassing van chromatografie en/of stroomcytometrie. Desalniettemin zal het veelal noch nodig, noch wenselijk zijn om de ongedifferentieerde cellen uitgebreid uit de celpopulatie te zuiveren,
20 omdat de andere cellen die in de populatie aanwezig zijn (bijvoorbeeld stromacellen) de cellevensvatbaarheid en -functie in stand kunnen houden.

Stroomcytometrie is een algemeen beproefde, betrouwbare en
25 krachtige techniek voor het kenmerken van cellen in gemengde populaties alsmede voor het sorteren van cellen. Aldus kunnen de zuiverings- of isolatiemiddelen een stroomcytometer omvatten. Stroomcytometrie werkt op basis van fysische eigenschappen van deeltjes in vloeibare suspensie, die van elkaar kunnen worden onderscheiden wanneer zij worden onderworpen aan een lichtstraal. Dergelijke deeltjes
30 kunnen uiteraard cellen zijn. Fysische kenmerken omvatten celgrootte en -structuur, of, zoals in de afgelopen jaren zeer populair is geworden, celoppervlakmerkers die zijn gebonden aan monoklonale antilichamen die geconjugeerd zijn aan fluorescerende moleculen.

35 In Kreisseg *et al.*, 1994, J. Hematother 3(4): 263-89 wordt gesteld dat "vanwege de beschikbaarheid van anti-CD-34-monoklonale antilichamen multiparameter-stroomcytometrie de eerste keus is voor een techniek voor het bepalen van hematopoietische stamcellen en voorlopercellen" en beschrijft algemene technieken voor het kwantificeren

en kenmerken van cellen die CD34 tot expressie brengen door middel van stroomcytometrie. Voorts beschrijft Korbling *et al.* de zuivering van CD34⁺-cellen door immunabsorptie, gevolgd door stroomcytometrie, gebaseerd op HLA-DR-expressie. Zoals hierboven is beschreven is CD34⁺ een bruikbare merker in samenhang met stamcellen/voorlopercellen.

Stroomcytometrietechnieken voor het sorteren van stamcellen, gebaseerd op andere fysische kenmerken zijn eveneens beschikbaar. Bijvoorbeeld beschrijft Visser *et al.*, 1980, Blood Cells 6:391-407 dat stamcellen kunnen worden geïsoleerd op basis van hun grootte en hun mate van gestructureerdheid. Grogan *et al.*, 1980, Blood Cells, 6: 625-44 beschrijft dat "levende stamcellen uit eenvoudige hematopoietische weefsels kunnen worden gesorteerd met een hoge en verifieerbare zuiverheid".

Na het selecteren van cellen op basis van de aanwezigheid van een celoppervlakmerker of een andere fysische eigenschap (positieve selectie) kunnen celpopulaties worden verrijkt, gezuiverd onder toepassing van negatieve kenmerken. Bijvoorbeeld kunnen cellen die lijn-specifieke merkers bezitten, zoals CD4, CD8, CD42 en CD3 uit de celpopulatie worden verwijderd met behulp van stroomcytometrie of affiniteitschromatografie.

Een zeer bruikbare techniek voor het zuiveren van cellen behelst het gebruik van antilichamen of andere affiniteitsliganden die aan magnetische bolletjes zijn gekoppeld. De bolletjes worden geïncubeerd met de celpopulatie en de cellen die een celoppervlakmerker, zoals CD34 bevatten, waaraan de affiniteitsligand bindt worden ingevangen. De monsterbuis die de cellen bevat wordt in een magnetische monster-concentratie-inrichting geplaatst, waarin de bolletjes naar de zijanten van de buis worden aangetrokken. Na een of meer wasstappen zijn de cellen waarin men is geïnteresseerd gedeeltelijk of in hoofdzaak volledig van de andere cellen gezuiverd. Wanneer dit in de vorm van negatieve selectie wordt toegepast, wordt in plaats van de cellen die aan de bolletjes zijn gebonden te wassen door de vloeibare fase weg te gooien, de vloeibare fase bewaard en worden aldus de cellen die aan de bolletjes zijn gebonden doelmatig uit de celpopulatie verwijderd.

Deze op ligandaffiniteit gebaseerde zuiveringswerkwijzen kunnen worden gebruikt bij elk celtype waarvoor geschikte merkers zijn gekarakteriseerd of kunnen worden gekarakteriseerd.

Urbankova et al., 1996 (J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. 687: 449-52) beschrijft de microbereiding van hematopoietische stamcellen uit een suspensie van muizenbeenmerg door zwaartekrachtveld-stroom-fractionering. Urbankova et al., 1996, beschrijft voorts dat de werkwijze werd gebruikt voor het karakteriseren van stamcellen uit muizenbeenmerg omdat deze cellen groter zijn dan de andere cellen in het beenmerg en dat het derhalve mogelijk was deze uit het mengsel te scheiden. Aldus kunnen andere fysische parameters dan celoppervlakmerkers worden gebruikt om stamcellen te zuiveren of te verrijken.

10 Celpopulaties die ongedifferentieerde cellen en gezuiverde ongedifferentieerde cellen omvatten die zijn gevormd door de werkwijzen volgens de uitvinding kunnen *in vitro* worden gehouden onder toepassing van bekende werkwijzen. Typisch worden minimale groeimedia gebruikt, zoals Hanks, RPMI 1640, Dulbecco's Minimaal Essentieel Medium (DMEM) of Iscove's Gemodiceerd Dulbecco Medium, aangevuld met zoogdierserum, zoals FBS, en naar wens autoloog plasma om een geschikte groeiomgeving voor de cellen te verschaffen. In een voorkeursuitvoeringsvorm worden de stamcellen gekweekt op voedingslagen, zoals lagen van stromacellen (zie Deryugina et al., 1993, Crit. Rev. Immunology, 20 deel 13: 115-150). Men neemt aan dat stromacellen factoren uitscheiden die voorlopercellen in een ongedifferentieerde toestand houden. Een lange-termijn kweekstelsel voor stamcellen is beschreven door Dexter et al., 1977 (J. Cell Physiol., deel 91: 335) en Dexter et al., 1979 (Acta. Hematol., deel 62: 299).

25 Bijvoorbeeld beschrijft Lebkowski et al. 1992 (Transplantation 53(5): 1011-9) dat menselijke CD34⁺ hematopoietische cellen kunnen worden gezuiverd onder toepassing van een technologie die is gebaseerd op het gebruik van monoklonale antilichamen die covalent zijn geïmmobiliseerd op polystyreenoppervlakken, en dat de CD34⁺-cellen 30 die door deze werkwijze zijn gezuiverd met een levensvatbaarheid van meer dan 85% kunnen worden gehouden. Lebkowski et al., 1993 (J. Hematother., 2(3): 339-42) beschrijft eveneens hoe men menselijke CD34⁺-cellen kan isoleren en kweken. Zie eveneens Haylock et al., 1994 (Immunomethods, deel 5(3): 217-25) voor een overzichtsartikel 35 van diverse werkwijzen.

Het bevestigen van stamcelidentiteit kan worden uitgevoerd onder toepassing van een aantal *in vitro*-tests, zoals CFC-tests (zie eveneens de voorbeelden). Zeer primitieve hematopoietische stamcellen worden veelal gemeten met de lange-termijn kweekinitiatiecel

(LTC-IC)-test (Eaves et al., 1991, J. Tiss. Cult. Meth., deel 13: 55-62). LTC-ICs ondersteunen hematopoiese gedurende 5 tot 12 weken.

Celpopulaties die ongedifferentieerde cellen omvatten en gezuiverde preparaten die ongedifferentieerde cellen omvatten kunnen worden ingevroren voor toekomstig gebruik. Geschikte technieken voor het invriezen van cellen en het later tot leven wekken van deze cellen zijn in het vakgebied bekend. Een inrichting volgens de uitvinding kan naar wens voorts invriesmiddelen omvatten voor het invriezen van celpopulaties die ongedifferentieerde cellen omvatten en/of gezuiverde preparaten die ongedifferentieerde cellen omvatten.

In een aspect vindt de teruggedifferentiatie bij voorkeur plaats bij cellen uit of in buffy-coat-bloedmonsters. De term "buffy-coat" duidt op de laag witte bloedcellen die wordt gevormd tussen de laag rode bloedcellen en het plasma wanneer ongestold bloed wordt gecentrifugeerd of wanneer men dit laat staan.

V. Verschuiving van de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in een celpopulatie

In normaal weefsel is het relatieve aantal van diverse celtypen, inclusief gedifferentieerde en ongedifferentieerde cellen op een bepaald tijdstip doorgaans constant. Het aantal witte bloedcellen in een gezond individu van 21 jaar oud is bijvoorbeeld typisch ongeveer 8×10^6 per ml, waarvan 27% lymfocyten zijn, 6% monocyten en 67% granulocyten. De concentraties van dergelijke cellen (inclusief zowel het relatieve aantal als het absolute cel aantal) wordt verstoord gedurende ziekte, zoals in het geval van leukemisch bloed van patiënten met B-cel chronische lymfocytische leukemie (B-CLL).

Het relatieve aantal (d.w.z. verhouding) van gedifferentieerde cellen kan worden verstoord of verschoven in bijvoorbeeld mononucleaire celfracties door volledig bloed of buffy-coats op histopaque te leggen om granulocyten te verwijderen, om aldus teruggedifferentiatie van gedifferentieerde cellen tot ongedifferentieerde cellen te bewerkstelligen, welke ongedifferentieerde cellen zelf zullen vernieuwen (prolifereren) en opnieuw differentiëren tot diverse celtypen om de verplaatste cellen aan te vullen.

Het relatieve aantal (d.w.z. verhouding) van gedifferentieerde cellen kan ook worden verstoord of verschoven in bijvoorbeeld buffy-coats (verkregen uit gezonde bloeddonoren) na verwijdering (door centrifugatie op een dichtheidsgradiëntenmedium of negatieve selectie

onder toepassing van met antilichaam beklede magnetische bolletjes) van rode bloedcellen, plaatjes, granulocyten, monocyten en T-lymfocyten. Deze behandeling kan negatieve selectie of verrijking van een bepaald type gedifferentieerde cel worden genoemd en is een voorbeeld
5 van een verplaatst weefsel. Wanneer dergelijke cellen worden gekweekt in bijvoorbeeld calciumbevattend medium, zoals Iscove's Gemodificeerd Dulbeccos Medium (ISDM) zullen gedifferentieerde cellen teruggedifferentiatie tot ongedifferentieerde cellen ondergaan, welke ongedifferentieerde cellen zelf zullen vernieuwen (prolifereren) en opnieuw
10 differentiëren tot een aantal verschillende celtypen om de verplaatste cellen aan te vullen.

Gedurende dit proces ziet men dat de cellen eerst tot kolonieën clusteren (ondergaan homocytische aggregatie) om teruggedifferentiatie te ondergaan. Zodra de meer toegewijde cellen worden omgezet in ongedifferentieerde cellen verkrijgen zij het vermogen te prolifereren en
15 om tot een aantal verschillende opnieuw gedifferentieerde celtypes te ontwikkelen, om het relatieve aantal verplaatste cellen aan te vullen.

Teruggedifferentiatiemiddelen die de verhouding van normale gedifferentieerde cellen in een celpopulatie werkzaam kunnen verplaatsen omvatten bijvoorbeeld antilichamen (zuivere en geconjugeerde, d.w.z. gebonden aan gefixeerde en vrije liganden, zoals bijvoorbeeld magnetische, glazen of polystyreenbolletjes); Histopaque, LymphoPrep of elk willekeurig dichtheidsgradiëntenmedium dat wordt gebruikt om
25 cellen te scheiden op basis van de dichtheid van de cellen; of Dextran (dat sedimentatie van bijvoorbeeld rode bloedcellen kan veroorzaken). Andere geschikte teruggedifferentiatiemiddelen zijn beschreven in een publicatie van Vettesse-Dadey (zie The Scientist (13 sept. 1999), 13 (18): 21).

30 Blootstelling van verplaatste cellen aan een geschikt chelermiddel, waaronder EDTA, EGTA en heparine (welk chelermiddel kan worden aangehaald als biologische respons-modificatiemiddel) kan teweegbrengen dat zelfs meer toegewijde cellen teruggedifferentiëren tot ongedifferentieerde cellen. Bijvoorbeeld veroorzaakte blootstelling van verplaatste cellen aan EDTA gedurende een van te voren bepaalde tijdsduur, gevolgd door het kweken van de cellen in een calciumbevattend medium dat cortison bevatte, dat meer toegewijde cellen teruggedifferentieerden tot ongedifferentieerde cellen. Deze cellen vernieuwden zich op hun beurt en doorliepen een nieuwe differentia-
35

5 tieketen, waardoor erythroïde voorlopers werden gevormd, zoals barst-
vormende eenheid-erythroïden (BFU-erythroïden). De erythroïd-voorlo-
pers kunnen gedurende lange tijdsperioden worden gekweekt, in aantal
worden vermeerderd en kunnen worden gebruikt voor de behandeling van
5 rode-bloedcelstoornissen en rode-bloedceltekorten.

VI. Wijzigen van de vrije-ionenconcentratie van een medium dat een celpopulatie omvat

Blootstelling van verschillende cellen aan een ionenchelerings-
10 middel, zoals bijvoorbeeld EGTA gedurende een bepaalde tijdsperiode,
gevolgd door het kweken van dergelijke cellen in een calciumbevattend
medium, zoals IMDM, dat hydrocortison bevat brengt teweeg dat meer
toegewijde cellen tot ongedifferentieerde cellen teruggedifferentiëren.
Deze cellen vernieuwen zich op hun beurt en zorgen dat nieuwe megaka-
15 ryocytische voorlopers worden gevormd, zoals kolonievormende eenheid-
megakaryocyten (CFU-Meg), die uiteindelijk plaatjes vormen.

VII. Werkwijze voor het hertoewijden van ongedifferentieerde cellen

Een belangrijke toepassing van ongedifferentieerde cellen vol-
20 gens de uitvinding ligt in de reconstitutie van weefsels, bijvoor-
beeld zenuwweefsel of hematopoietische cellen. Dit behelst het diffe-
rentiëren van ongedifferentieerde cellen, gevormd door de werkwijzen
van de uitvinding. Dit kan worden uitgevoerd door op eenvoudige wijze
de ongedifferentieerde cellen aan een patiënt toe te dienen, typisch
25 op een specifieke plaats waarin men is geïnteresseerd, zoals het
beenmerg, ruggemerg of long, waarbij de natuurlijke fysiologische
toestand binnen de patiënt differentiatie kan bewerkstelligen. Een
specifiek voorbeeld hiervan is de reconstitutie of aanvulling van het
hematopoietische systeem, bijvoorbeeld bij AIDS-patiënten met een
30 verlaagd aantal CD4⁺-lymfocyten.

Als alternatief kan differentiatie (hierin eveneens "hertoewij-
ding" genoemd) *in vitro* worden bewerkstelligd waarna de vermeerderde
cellen bijvoorbeeld therapeutisch worden toegediend. Dit wordt door-
gaans uitgevoerd door het toedienen van groeifactoren. Bijvoorbeeld
35 is retinolzuur gebruikt om ES-cellen tot neuronale cellen te diffe-
rentiëren. Methylcellulose, gevolgd door het gezamenlijk kweken met
een beenmerg-stromalijn en IL-7 is gebruikt om ES-cellen te differen-
tiëren tot lymfocytvoorlopers (Nisitani *et al.*, 1994, *Int. Immunol.*,
deel 6(6): 909-916). Le Page (*New Scientist*, 16 december 2000) be-

schrijft dat ES-cellen tot longepitheelcellen kunnen differentiëren. Bischoff, 1986 (Dev. Biol., deel 115(1): 129-39) beschrijft hoe men spier-satellietcellen kan laten differentiëren tot rijpe spiervezels. Neurale voorlopercellen kunnen worden vermeerderd met basische fibroblastgroeifactor en epidermale groeifactor (Nakafuku en Nakamura, 1995, J. Neurosci. Res., deel 41(2): 153-168). Hematopoietische stamcellen kunnen worden vermeerderd onder toepassing van een aantal groeifactoren, waaronder GM-CSF, erythropoetine, stamcelfactor en interleukines (IL-1, IL-3, IL-6) - zie Metcalf, 1989 (Nature, deel 339: 27-30) voor een overzichtsartikel van deze diverse factoren.

Potocnik et al. (EMBO. J., deel 13(22): 5274-83) heeft zelfs de differentiatie van ES-cellen tot hematopoietische cellen aangetoond waarbij omstandigheden met een lage zuurstofconcentratie (5%) werden gebruikt.

Aldus ondergaat in een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvin- ding de ongedifferentieerde cel vervolgens toewijding tot een hertoe- gewijde cel, zoals een gedifferentieerde cel. De hertoegegewijde cel kan van dezelfde lijn zijn als de meer toegewijde cel, waarvan de on- gedifferentieerde cel was afgeleid. Het is ook mogelijk dat de her- toegewijde cel van een andere lijn dan de meer toegewijde cel waarvan de ongedifferentieerde cel was afgeleid kan zijn. Bijvoorbeeld kan een B-lymfocyt worden teruggedifferentieerd tot een CD34⁺ CD38⁻ HLA-DR⁻-stamcel. De stamcel kan vervolgens worden hertoegegewijd langs een B-cellijn (dezelfde lijn) of langs een lymfoïde lijn (een andere lijn).

Toewijding van de ongedifferentieerde cellen tot een hertoege- wijde cel, zoals een gedifferentieerde cel, kan op diverse wijzen die de vakman bekend zijn worden teweeggebracht. Met name kan differen- tiatie tot gekozen cellen worden bewerkstelligd door de ongedifferen- tieerde cellen te kweken op een bepaalde wijze en in een bepaald me- dium.

Ongedifferentieerde cellen kunnen bijvoorbeeld worden gediffe- rentieerd tot cardiale myocyten door het onderstaande kweekregiem te volgen:

Dag 1: Spreid de ongedifferentieerde cellen bij normale dicht- heid op een met gelatine behandelde plaat om de kweek vrij te maken van verontreinigende fibroblastcellen.

Behandel de cellen met trypsine zoals voor een normale spre- ding, totdat de kolonieën loslaten. Handel voorzichtig om de losse

aan elkaar gehechte celklompen in stand te houden. Plaat de cellen dan direct in een verhouding van 1:3 uit in Petrischalen van bacteriologische kwaliteit in LIF-vrij ES-celkweekmedium (zie hieronder).

5 Dag 3: Zuig het medium voorzichtig af. Vermijd het opzuigen van teveel aggregaten. Ververs vervolgens het medium.

Dag 5: Zuig op zoals op Dag 3 en vervang het medium.

Dag 7: Plaat de cellen uit op een 24-wiels plaat van weefselkweekkwaliteit.

10 Dag 9: Ververs de helft van het medium en neem drijven van cellen waar.

Dag 11: Ververs de helft van het medium en neem drijven van cellen waar.

15 Als ander voorbeeld kunnen de ongedifferentieerde cellen worden gedifferentieerd tot gliacellen en zenuwen door het volgen van onderstaande procedure:

Dag 1: Spreid de ongedifferentieerde cellen bij normale dichtheid uit op een met gelatine behandelde plaat om de kweek vrij te maken van verontreinigde fibroblastcellen.

20 Behandel de cellen met trypsine zoals voor een normale spreading totdat de kolonies loslaten. Behandel voorzichtig om de losse aan elkaar gehechte celklompen in stand te houden. Plaat de cellen dan direct in een verhouding van 1:3 uit in Petrischalen van bacteriologische kwaliteit in LIF-vrij medium dat 1µM volledig trans-retinolzuur (verkrijgbaar van Sigma) bevat.

25 Dag 3: Verzamel celaggregaten en plaat deze opnieuw uit in weefselkweekschalen (ongeveer 25 celaggregaten per weefselkweekschaal van 6 cm) in ES-celkweekmedium zonder LIF of RA. Zuig het medium voorzichtig af.

30 Dag 8: Ververs de helft van het medium. Vanaf deze dag vertonen ten minste 10% van de cellen neuronale fenotypen. Zij worden specifiek gekleurd met Cresyl Violet en zijn sterk positief voor het N-CAM-antigen.

35 Een vakman is op de hoogte van geschikte werkwijzen voor het bewerkstelligen van de toewijding van een ongedifferentieerde cel tot elke willekeurige gekozen gedifferentieerde cel.

Een ongedifferentieerde stamcel volgens de uitvinding kan worden gekweekt met behulp van elke routinematige embryonale stamcel(ES)kweektechniek. Een geschikt medium voor een ongedifferentieer-

de of ES-celkweek wordt als voorbeeld hieronder gedetailleerd beschreven.

Voor het bereiden van 100 ml medium:

DMEM (GIBCO cat# 11965-062)	80 ml
15% FCS	15 ml
Pen/Strep	1 ml
L-Glutamine	1 ml
MEM niet-essentiële aminozuren (GIBCO cat# 11140-050)	1 ml
Lif (10^5 E/ml)	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

5

Het Lif wordt geleverd in 1 ml-ampullen als LIF ESGRO AMRAD met 10^7 E/ml en dit kan in 100 ml DMEM en 10% FCS worden verdund en in hoeveelheden van 5 ml bij -20°C worden opgeslagen.

Met betrekking tot BME kan 0,1 ml BME (14,4 M) worden toegevoegd aan 14,3 ml PBS, hetgeen wordt gefiltreerd door een acroschijf van 0,2 μm , en kan gedurende 1 maand bij -20°C worden bewaard.

Een ander geschikt medium kan bijvoorbeeld PMEF-medium zijn, waarvan 100 ml kan worden bereid zoals hieronder in detail is beschreven:

15

DMEM (GIBCO cat# 11965-062)	88 ml
10% FCS	10 ml
Pen/Strep	1 ml
L-Glutamine	1 ml
BME (0,1 M)	0,2 ml

Andere geschikte media voor het kweken van ES-cellen kunnen door de vakman op eenvoudige wijze worden gevonden.

20 VIII. Tests voor het identificeren van terugdifferentiatieagentia

Naast bovengenoemde middelen kunnen andere geschikte middelen worden geïdentificeerd onder toepassing van testwerkwijzen volgens WO96/23870 of volgens deze uitvinding. Met betrekking tot de laatste verschaft de uitvinding eveneens een werkwijze voor het identificeren van een stof die in staat is om een toegewijde/gedifferentieerde cel terug te differentiëren tot een ongedifferentieerde cel, welke werkwijze omvat het in contact brengen van een celpopulatie die toegewij-

de cellen omvat met een kandidaatstof en het bepalen of er een toename in de relatieve aantallen ongedifferentieerde cellen in genoemde celpopulatie optreedt, waarin het in contact brengen plaatsvindt in de aanwezigheid van een buffy-coat.

5 Geschikte kandidaatstoffen omvatten liganden die binden aan celoppervlak-receptoren, zoals antilichaamproducten (bijvoorbeeld monoklonale en polyklonale antilichamen, enkelketenige antilichamen, chimere antilichamen en CDR-geënte antilichamen), zoals antilichamen die aan celoppervlak-receptoren binden. Celoppervlak-receptoren
10 waarin men in het bijzonder is geïnteresseerd zijn hierboven omschreven en omvatten MHC-receptoren en oppervlakeiwitten met CD-benamingen, zoals CD4 en CD8. Andere liganden die aan celoppervlak-receptoren binden omvatten groeifactoren.

 Voorts kunnen combinatoire bibliotheken, peptide en peptidemi-
15 metica, gedefinieerde chemische groepen, oligonucleotiden en natuurlijke productbibliotheken worden gescreeend op werkzaamheid als terugdifferentiatieagentia. De kandidaatstoffen kunnen worden gebruikt in een eerste screen in ladingen van bijvoorbeeld 10 stoffen per reactie en de stoffen van de ladingen die remming vertonen worden afzonder-
20 lijk getest.

 Een typische test omvat het plaatsen van een hoeveelheid cellen die toegewijde cellen omvatten in een geschikte houder, zoals een plaat met meerdere putjes. Een kandidaatstof wordt aan het putje toegevoegd en de cellen worden in het putje geïncubeerd. De incubaties
25 worden typisch bij ongeveer kamertemperatuur, bijvoorbeeld bij ongeveer 22°C tot ongeveer 37°C, inclusief 33°C uitgevoerd.

 Terugdifferentiatie kan worden gemeten door het verwijderen van een kleine hoeveelheid cellen en door de cellen met behulp van microscopie en/of stroomcytometrie te onderzoeken om te bepalen of er een
30 wijziging in de aantallen ongedifferentieerde cellen heeft plaatsgevonden. Typisch wordt de bepaling van wijzigingen in het aantal ongedifferentieerde cellen uitgevoerd door het nagaan van wijzigingen in de aantallen van cellen met celoppervlakmerkers die kenmerkend zijn voor ongedifferentieerde cellen, ofschoon morfologische wijzigingen
35 eveneens als leidraad kunnen worden gebruikt. Voorbeelden van geschikte celoppervlakmerkers omvatten CD34⁺. Als alternatief of als aanvulling kunnen afnamen in het aantal cellen met celoppervlakmerkers die typisch zijn voor gedifferentieerde cellen en voor niet-gedifferentieerde cellen worden nagegaan, bijvoorbeeld een afname in de

relatieve aantallen van cellen die lijn-specifieke merkers zoals CD3, CD4 en CD8 bevatten.

Bij voorkeur vindt een verhoging in aantal cellen met kenmerken die typisch zijn voor ongedifferentieerde cellen binnen 24 uur, bij
5 voorkeur tussen 4-8 uur plaats, zodat de wijzigingen niet alleen maar kunnen worden toegeschreven aan celproliferatie.

Het kan gewenst zijn om van te voren te screenen op middelen die bijvoorbeeld binden aan celoppervlak-receptoren, zoals MHC-
klasse I- of klasse II-receptoren. De agentia die worden geïdentifi-
10 ceerd als bindend aan doelwit-celoppervlak-receptoren kunnen vervolgens in bovengenoemde test worden gebruikt om hun effect op teruggedifferentiatie te bepalen. Als bijzonder voorbeeld kunnen faag-display-bibliotheken die antilichaambindende domeinen tot expressie brengen worden gebruikt om antilichaamfragmenten (typisch scFvs) te identifi-
15 ceren die binden aan een doelwitceloppervlakmarker, zoals het homologe gebied van de β -keten van MHC-klasse II receptoren. Geschikte bindingstests zijn in het vakgebied bekend, net zoals de vorming en screening van faag-display-bibliotheken. Tests kunnen eveneens worden gebruikt om geoptimaliseerde antilichamen of antilichaamfragmenten te
20 identificeren, bijvoorbeeld om een gemutageniseerde bibliotheek van derivaten van een antilichaam waarvan reeds is getoond dat het teruggedifferentiatie bewerkstelligt, te screenen.

IX. Toepassingen

25 De uitvinding verschaft werkwijzen van en een inrichting voor het teruggedifferentiëren van toegewijde cellen tot ongedifferentieerde cellen. In het bijzonder verschaft de uitvinding een werkwijze en inrichting voor het bereiden van een stamcel uit een meer gedifferentieerde cel. De klinische implicaties hiervan zijn enorm omdat stam-
30 cellen in een groot aantal therapeutische toepassingen worden gebruikt, maar waren tot nu toe moeilijk, problematisch en soms ethisch controversieel te verkrijgen.

Stamcellen die volgens de uitvinding worden gevormd kunnen worden gebruikt om specifieke celpopulaties in een patiënt opnieuw te
35 vormen, zoals een hematopoietische celpopulatie of een subpopulatie daarvan, zoals CD4-T-lymfocyten. De meer toegewijde cellen die worden gebruikt om de stamcellen te vormen kunnen uit dezelfde patiënt of een passende donor afkomstig zijn. Aldus kunnen stamcellen die volgens de uitvinding zijn gevormd worden gebruikt om gespecialiseerd

celweefsel en organen te helen en te reconstitueren. Bijvoorbeeld kunnen ongedifferentieerde cellen worden gebruikt om hertoegewijde cellen te vormen, zoals de cellen die de longblaasjes bekleden, waarbij aldus een mechanisme wordt gevormd waardoor beschadigd of ziek
5 longweefsel kan worden vervangen of gerepareerd (zie Le Page, New Scientist, 19 december 2000, blz. 20).

Aldus kunnen de stamcellen die volgens de uitvinding worden gevormd in de patiënt worden ingebracht om in het lichaam nieuwe celpopulaties te vormen. Op geschikte wijze worden de stamcellen eerst
10 geënt en vormen vervolgens een nieuwe populatie.

Op geschikte wijze kunnen stamcellen *in vivo* worden ingebracht met behulp van liposomale overdracht.

Aldus omvat de uitvinding eveneens een geneesmiddel, omvattend een ongedifferentieerde cel, bereid door een van deze werkwijzen of
15 door de inrichting, gemengd met een geschikt(e) diluens, drager of excipient.

In een uitvoeringsvorm kan het geneesmiddel dat de ongedifferentieerde cel omvat worden gebruikt om een voordelige meer toegewijde cel te vormen, zoals een cel met een correcte genoomstructuur om
20 symptomen of ziekten te verlichten die worden veroorzaakt door of zijn geassocieerd met een meer toegewijde cel met een niet-correcte genoomstructuur. Aldus verschaft de uitvinding tevens een werkwijze voor het verwijderen van een verkregen mutatie uit een meer toegewijde cel, waarin de werkwijze omvat het vormen van een ongedifferentieerde cel door de werkwijze volgens de uitvinding, het toewijden
25 van de ongedifferentieerde cel tot een hertoegewijde cel, waarbij rangschikking of herrangschikking van het genoom en/of de kern van de cel ertoe leidt dat de mutatie wordt verwijderd.

Bij voorkeur wordt het gen ingebracht in het immuunglobulinegebied of TCR-gebied van het genoom.
30

De uitvinding verschaft eveneens een werkwijze voor het behandelen van een patiënt die lijdt aan een ziekte of een stoornis die voortvloeit uit een defectieve of een ongewenste cel, waarbij de werkwijze omvat het bereiden van een ongedifferentieerde cel door het
35 in contact brengen van een meer toegewijde cel met een agens dat te weegbrengt dat de meer toegewijde cel teruggedifferentieert tot de ongedifferentieerde cel en vervolgens naar wens het toewijden van de ongedifferentieerde cel tot een hertoegewijde cel, waarin de ongedifferentieerde cel, of de hertoegewijde cel, bewerkstelligt dat de de-

fectieve cel of de ongewenste cel de symptomen van de ziekte of stoornis verlicht of de patiënt heelt van de ziekte of de aandoening.

Als alternatief kunnen de ongedifferentieerde cellen worden gebruikt om een meer toegewijde cel te vormen die entiteit vormt die
5 symptomen of aandoeningen heelt die worden veroorzaakt door of geassocieerd zijn met een meer toegewijde cel met een oncorrecte genoomstructuur.

De uitvinding kan bijvoorbeeld worden toegepast om antilichamen of T-cel-receptoren te vormen tegen een antigen dat tot expressie
10 wordt gebracht door de meer toegewijde cel, die is teruggedifferentieerd tot de ongedifferentieerde cel. In dit opzicht kan het antigen een feto-specifiek antigen of een kruis-reactief feto-specifiek antigen zijn.

De uitvinding omvat eveneens een werkwijze voor en een inrichting voor het beheersen van de concentraties ongedifferentieerde
15 cellen en meer toegewijde cellen. De uitvinding omvat bijvoorbeeld een werkwijze, omvattend het vormen van een ongedifferentieerde cel door de werkwijze volgens de uitvinding en het vervolgens activeren van een apoptosegen om de ongedifferentieerde cel te treffen, zoals
20 te veroorzaken dat deze sterft.

In een voorkeursuitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het inbrengen van een gen in het genoom van een ongedifferentieerde cel, waarin de werkwijze omvat het inbrengen van het gen in een meer toegewijde cel en vervolgens het bereiden van een
25 ongedifferentieerde cel door de werkwijze volgens de uitvinding, waarbij het gen in de ongedifferentieerde cel aanwezig is.

In een uitvoeringsvorm die meer voorkeur verdient heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het inbrengen van een gen in het genoom van een ongedifferentieerde cel, waarin de werkwijze omvat
30 het inbrengen van het gen in het genoom van een meer toegewijde cel en vervolgens het bereiden van een ongedifferentieerde cel met de werkwijze volgens de uitvinding, waarbij het gen in de ongedifferentieerde cel aanwezig is.

Het gen kan een gen zijn dat de ongedifferentieerde cel en meer
35 gedifferentieerde cellen die daaruit worden verkregen meer resistent maakt tegen pathogene infecties, zoals virale infecties. In het bijzonder kunnen bijvoorbeeld B-lymfocyten uit AIDS-patiënten worden gebruikt om stamcellen te vormen die vervolgens worden gemanipuleerd om resistent te zijn tegen HIV-infectie. Wanneer deze worden vermeerderd

en in de patiënten worden ingebracht kunnen de hieruit voortvloeiende helper-T-lymfocyten eveneens resistent tegen HIV-infectie zijn.

In een andere uitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het inbrengen van een gen in een ongedifferentieerde cel, waarin de werkwijze omvat het inbrengen van het gen in het genoom van een meer toegewijde cel en het vervolgens bereiden van een ongedifferentieerde cel met de werkwijze volgens de uitvinding, waarbij het gen in het genoom van de ongedifferentieerde cel aanwezig is.

10 Bovendien omvat de uitvinding eveneens de werkwijze volgens de uitvinding voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel, waarin de werkwijze omvat het toewijden van de ongedifferentieerde cel tot een hertoegewijde cel en het vervolgens fuseren van de hertoegewijde cel tot een myeloom. Dit maakt de *in vitro*-expressie van grote hoeveelheden van het gewenste product, zoals een antilichaam of antigeen of een hormoon etc. mogelijk.

De uitvinding omvat eveneens een ongedifferentieerde cel, bereid door elk van deze werkwijzen volgens de uitvinding.

In een andere uitvoeringsvorm kan de inrichting en/of werkwijze volgens de uitvinding worden gebruikt om op doelmatige wijze erythroïde voorlopers te kweken voor de bereiding van erythrocyten, welke erythrocyten kunnen worden gebruikt om tekorten in bijvoorbeeld bloedleveringen aan te vullen. Op geschikte wijze kan een werkwijze volgens de uitvinding worden gebruikt om megakaryocyten te vormen voor toepassing in de bereiding van plaatjes.

In een andere uitvoeringsvorm kan de inrichting en/of werkwijze volgens de uitvinding worden gebruikt voor de bereiding van banken van ongedifferentieerde cellen, d.w.z. banken van behandelde cellen.

Andere aspecten van de uitvinding omvatten:

30 - de toepassing van elk van de agentia volgens de uitvinding voor het bereiden van een ongedifferentieerde cel uit een meer toegewijde cel,

 - de toepassing van een ongedifferentieerde cel, gevormd volgens de werkwijze van de uitvinding voor het bereiden van een monoklonaal of polyklonaal of een specifiek antilichaam uit een B-lymfocyt of een T-lymfocyt; een cel van de macrofaag-monocyttlijn; een genucleëerde cel die in staat is tot expressie van klasse I- of klasse II-antigenen; een cel die in staat is om te worden geïnduceerd tot expressie van klasse I- of klasse II-antigenen; een geënuclueëerde

cel; een gefragmenteerde cel; of een apoptische cel,

- de toepassing van een ongedifferentieerde cel, gevormd volgens de werkwijze van de uitvinding voor het vormen van effector-T-lymfocyten uit B-lymfocyten en/of vice versa,

5 - de toepassing van een ongedifferentieerde cel, gevormd volgens de werkwijze van de uitvinding voor het vormen van een of meer van: een geneesmiddel, zoals een geneesmiddel, omvattend of gemaakt van een B-lymfocyt, een T-lymfocyt, een cel van de macrofaag-monocytlijn, een gennucleëerde cel die klasse I- of klasse II-antigen tot expressie kan brengen; een cel die geïnduceerd kan worden tot het tot
10 expressie brengen van een klasse I- of klasse II-antigen, of een geënuclueëerde cel.

De uitvinding omvat eveneens werkwijzen waarbij gebruik wordt gemaakt van bovengenoemde toepassingen en voortbrengselen of samen-
15 stellingen die volgens dergelijke werkwijzen zijn bereid.

De uitvinding omvat eveneens een geneesmiddel, omvattend een ongedifferentieerde cel volgens de uitvinding of een voortbrengsel dat daarmee is verkregen, gemengd met een geschikt(e) diluens, drager of excipiëns.

20 In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat het geneesmiddel een antilichaam of antigen, verkregen uit een ongedifferentieerde cel volgens de uitvinding, gemengd met een geschikt(e) diluens, drager of excipiëns.

Bij voorkeur is het geneesmiddel voor de behandeling van een of
25 meer van: kanker, autoimmuunziekten, bloedstoornissen, cellulaire of weefselregeneratie, orgaanregeneratie, de behandeling van orgaan- of weefseltransplantaten of aangeboren stofwisselingsstoornissen.

De werkwijze volgens de uitvinding en voortbrengselen die met deze werkwijzen zijn verkregen, zoals ongedifferentieerde cellen,
30 kunnen worden gebruikt bij onderzoek, bijvoorbeeld voor het onderzoeken van terugdifferentiatie, differentiatie en voor het identificeren en onderzoeken van nieuwe ontwikkelingsantigenen en cluster-differentiatie-antigenen.

35 **X. Toediening**

Stamcellen en hertoegewijde cellen volgens de uitvinding, alsmede middelen waarvan is getoond dat deze cellen terugdifferentiëren kunnen bij therapeutische werkwijzen worden toegepast. Bij voorkeur worden de cellen of middelen volgens de uitvinding gecombineerd met

diverse bestanddelen voor de vorming van samenstellingen volgens de uitvinding. Met meer voorkeur worden de samenstellingen gecombineerd met een farmaceutisch aanvaardbare drager of diluens voor de vorming van een farmaceutische samenstelling (die voor menselijke of dierlijke toepassing kan zijn). Geschikte dragers en diluentia omvatten isotonische zoutoplossingen, bijvoorbeeld fosfaat-gebufferde zoutoplossing. De samenstelling volgens de uitvinding kan worden toegediend door directe inspuiting. De samenstelling kan worden geformuleerd voor parenterale, intramusculaire, intraveneuze, subcutane, intraoculaire, orale of transdermale toediening.

Samenstellingen die cellen omvatten worden typisch afgegeven door injectie of implantatie. Cellen kunnen worden afgegeven in suspensie of ingebed in een dragermatrix, zoals natuurlijke en/of synthetische biologisch afbreekbare matrices. Natuurlijke matrices omvatten collageenmatrices. Synthetische biologisch afbreekbare matrices omvatten polyanhydriden en polymelkzuur. Deze matrices verschaffen een drager voor kwetsbare cellen *in vivo* en verdienen de voorkeur voor niet-hematopoietische cellen.

Afgifte kan eveneens plaatsvinden met behulp van gecontroleerde afgifte, d.w.z. gedurende een bepaalde tijdsduur, die kan variëren van enkele minuten tot diverse uren of dagen. Afgifte kan systemisch zijn (bijvoorbeeld door intraveneuze inspuiting) of zijn gericht op een bepaalde plaats waarin men is geïnteresseerd.

Cellen worden typisch toegediend in doses van 1×10^5 tot 1×10^7 cellen per kg. Bijvoorbeeld kan aan een patiënt van 70 kg 14×10^6 CD34⁺-cellen worden toegediend voor de reconstitutie van hematopoietische weefsels.

De beschreven toedieningsroutes en doseringen zijn slechts bedoeld als richtlijn, omdat een ervaren vakman op eenvoudige wijze in staat zal zijn de optimale toedieningsroute en dosering voor elke willekeurige patiënt en aandoening te bepalen.

Alle werkwijzen die hieronder gedetailleerd worden beschreven zijn geschikt voor toepassing met een inrichting volgens de uitvinding.

35

A. MATERIAAL EN METHODEN

PATIENTEN

Bloedmonsters werden in buizen met lavendelkleurige bovenzijde waarin EDTA was opgenomen verkregen van patiënten met chronische B-

cel-lymfocytische leukemieën, patiënten met antilichaamdeficiëntie (waaronder IgA-deficiëntie en X-gekoppelde infantiele hypogammaglobulinemieën), patiënten met HIV-infecties en AIDS-syndroom, een patiënt met CMV-infectie, een patiënt met Hodgkin's-lymfoma's, een patiënt met acute T-cel-leukemie, een 6 dagen oude baby met blastocytose, diverse patiënten met diverse infecties en klinische aandoeningen, navelstrengbloed, beenmerg en verrijkte B-lymfocytpreparaten van gezonde bloeddonoren. Eveneens werden buffy-coat-bloedmonsters verkregen van gezonde donoren.

10

KLINISCHE EN EXPERIMENTELE OMSTANDIGHEDEN

De klinische en experimentele behandelingsomstandigheden van patiënten, inclusief diverse behandelingstypen die zijn gebruikt voor hun bloedmonsters zijn in Tabel 1 beschreven. Differentiële witte-
15 bloedcel(WBC)-tellingen werden verkregen met een Coulter-telinrichting en deze zijn in dezelfde tabel opgenomen.

BEHANDELING VAN BLOED

Bloedmonsters werden, eenmaal verkregen, samen met een zuiver
20 monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen (DAKO) in een kamer ingebracht, hetgeen men gedurende maximaal 24 uur bij kamertemperatuur liet roeren. Enkele monsters werden eerst gedurende 15 minuten gemengd, waarna men deze in de kamer bij 22°C liet incuberen. De concentratie van het monoklonaal
25 antilichaam dat aan de bloedmonsters werd toegevoegd varieerde van 10-50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ bloed.

Bovendien werden andere behandelingen bij dezelfde concentraties uitgevoerd, en deze omvatten het toevoegen van een monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de α -keten van het HLA-DR-
30 antigen, een monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van klasse I-antigenen, een monoklonaal antilichaam tegen CD4, een monoklonaal antilichaam tegen CD8, een PE-geconjugeerd monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen.

35 Andere behandelingen omvatten de gelijktijdige toediening van monoklonale antilichamen tegen de homologe gebieden van de α - en β -ketens van het HLA-DR-antigen aan bloedmonsters.

Voorts werden alkyleringsmiddelen zoals cyclofosfoamide aan bloedmonsters toegevoegd, in combinatie met een zuiver monoklonaal

antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen.

Na deze behandelingen werden bloedmonsters gekleurd met reeksen gemerkte monoklonale antilichamen, volgens de instructies van de fabrikant en vervolgens met behulp van stroom-cytometrie geanalyseerd.

De incubatietijden met monoklonale antilichamen varieerden van perioden van 2 uur, 4 uur, 6 uur, 12 uur tot 24 uur.

GEMERKTE ANTILICHAMEN

10 De volgende monoklonale antilichamen werden gebruikt voor het aantonen van de volgende merkers op cellen door middel van stroom-cytometrie: CD19 en CD3, CD4 en CD8, DR en CD3, CD56 & 16 en CD3, CD45 en CD14, CD8 en CD3, CD8 en CD28, simultane testcontrole (IgG1 FITC + IgG2a PE), CD34 en CD2, CD7 en CD13 & 33, CD10 en CD25, 15 CD5 en CD10, CD5 en CD21, CD7 en CD5, CD13 en CD20, CD23 en CD57 en CD25 en CD45 RA (Becton & Dickenson en DAKO). Aanvullende merkers kunnen omvatten CD71 (rode-bloedcelmerker), CD61 (megakaryocytmmerker), glycoforine A (rode-bloedcelmerker), AC133 (stamcelmerker), CD38 (primitieve-stamcelmerker), CD90 (stamcelmerker) en CD117 (plu- 20 ripotente-stamcelmerker).

Van elke patiënt werd het bloedmonster, zowel behandeld als onbehandeld, en elk omvattend een buffy-coat-monster, geanalyseerd met een aantal van bovengenoemde reeks in een inrichting volgens de uitvinding voor het verkrijgen van de immuunfenotypische veranderingen 25 die gepaard gingen met de verschillende behandelingstypen en deze werden uitgevoerd op verschillende monsters van hetzelfde bloedmonster. Onbehandelde bloedmonsters en andere controlebehandelingen werden gelijktijdig hiermee gekleurd en geanalyseerd.

30 STROOMCYTOMETRIE

Het volledige bloedmonster werd gekleurd en gelyseerd volgens de instructies van de fabrikant. Stroomcytometrieanalyse werd uitgevoerd op een FACScan® met ofwel een simultane test ofwel met PAINT A GATE-software (BDIS) waarbij negatieve back-trackingcontroles waren 35 opgenomen. Er werden 10.000 tot 20.000 gebeurtenissen verkregen en opgeslagen in lijst-modusbestanden (list mode files).

MORFOLOGIE

De morfologie werd geanalyseerd met behulp van microscopie en Wright's-kleuring.

5 BEREIDING VAN STAMCELLEN UIT VERRIJKTE OF GEZUIVERDE B-CLL (OF NORMALE)-LYMFOCYTEN OF UIT BUFFY-COAT-BLOEDMONSTERS

Gedurende de volgende procedures dienen aseptische technieken te worden toegepast:

10 (A) Mononucleaire celscheiding

- (i) Verkrijg mononucleaire cellen uit perifeer bloed/buffy-coat-monsters door centrifugatie op Histopaque, Lymphoprep of elk ander lymfocyt-scheidingsmedium (sp. dichtheid 1,077) gedurende 30 min. bij 400g.
- 15 (ii) Verzamel mononucleaire cellen in een conische buis van 50 ml en was dit met 30 ml Hank's gebalanceerde zoutoplossing (Ca^{2+} - en Mg^{+} -vrij, Sigma) dat 2% warmte-geactiveerd foetaal kalfsserum (FCS) in 2 mM EDTA of 0,5% citraat bevat en centrifugeer dit gedurende 10 min. bij 400 g.
- 20 (iii) Tel na het wassen de cellen en bepaal de levensvatbaarheid met trypanblauw en een hemocytometer.
 - (iv) Wanneer de B-celhoeveelheid hoog is, boven 70% ($20 \times 10^9/\ell$, WBC), ga direct door naar A (vi).
 - (v) Wanneer de B-celhoeveelheid laag is, onder 70% ($20 \times 10^9/\ell$, WBC), voer een negatieve selectie uit met Macs-microbolletjes of de Facs Vantage-zuiveringstechniek, zoals hieronder bij C is beschreven.
 - (vi) Resuspendeer het celpellet bij een concentratie van $3 \times 10^6/\text{ml}$ in IMDM-medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycine) dat 10% FCS (warmte-geïnactiveerd) en 10% HS (warmte-geïnactiveerd) bevat en plaats dit in een bloedzak. Noot: wanneer geen FCS en HS beschikbaar is, gebruik dan 20% tot 50% autoloog plasma.

35 BEREIDING VAN (ONGEDIFFERENTIEERDE) STAMCELLEN IN MONONUCLEAIRE FRACTIES, VERKREGEN UIT PERIFERE BLOEDMONSTERS OF PATIENTEN MET B-CLL

Volg bovenstaand protocol voor mononucleaire celscheiding (A), behalve dat de negatieve selectie niet moet worden uitgevoerd wanneer de witte-bloedcelhoeveelheid hoger is dan 20×10^6 per ml, waarvan meer dan 50% van de witte bloedcellen B-cellen zijn.

De volgende procedures kunnen worden uitgevoerd in een inrichting volgens de uitvinding.

(B) Celbehandeling met zuiver CR3/43 (Dako) monoklonaal antilichaam

5 Nadat mononucleaire celscheiding in A (vi) is verkregen, ga als volgt verder.

(i) Plaats de invoerbloedzak (van A (vi) hierboven) aan een dragerhaak,

(ii) Gebruik een kamer met zes putjes, programmeer de inrichting voor het toevoegen van 2 ml celsuspensie uit de invoerbloedzak [uit A (vi) hierboven] aan elk putje van deze multi-putjeskweekplaat of -kamer.

(iii) Programmeer de inrichting voor het behandelen van een geschikt aantal putjes met elk 99 µl/ml (of 49,5 µl/ml bij buffy-coat-monsters) CR3/43 (zuiver monoklonaal antilichaam, Dako) uit een injectiespuit die CR3/43-monoklonaal antilichaam bevat, en laat de andere putjes onbehandeld (negatieve controle).

(iv) Incubeer de kamer in 5% CO₂ bij 37°C (of 33°C) in een vochtige omgeving.

20

(C) Zuivering van cellen:

Diverse werkwijzen zijn bekend voor de scheiding en zuivering van cellen (zie Vettease - Dadey Scientist 13(18): 21, 13 sept. 1999).

Een geschikte werkwijze is de negatieve selectie van B-cellen met MACs-microbolletjes (Miltenyi Biotec, het beste is om hier de instructies dan de fabrikant te volgen):

(i) Verkrijg de mononucleaire cellen volgens A hierboven.

(ii) Draai de cellen af en resuspendeer deze in een eindvolume van 300 µl per 10⁸ cellen in HBSS (bestaande uit 2% FCS en 2 mM EDTA of 0,6% citraat).

(iii) Voeg per 10⁸ cellen 100 µl zuiver monoklonaal antilichaam tegen CD2 (IgG1, DAKO) toe.

(iv) Voeg aan dezelfde celsuspensie per 10⁸ cellen 50 µl zuiver monoklonaal antilichaam tegen CD43 (IgG1, DAKO) toe.

35 (v) Laat dit mengsel gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur incuberen.

(vi) Was de cellen met HBSS (dat 2% FCS en 2 mM EDTA bevat) en resuspendeer tot een eindconcentratie van 400 µl per 10⁸ cellen met

dezelfde buffer. Centrifugeer gedurende 10 min. bij 400 g. Resuspendeer het pellet in HBSS (zoals hierboven).

(vii) Voeg 100 ml konijn-anti-muis-IgG1-gemerkte microbolletjes toe per 10^8 cellen (of volg de instructies van de fabrikant).

5 (viii) Mix de cellen grondig en incubeer gedurende 15 minuten bij 6-12°C (koelkast).

(ix) Was de cellen opnieuw met HBSS (dat 2% FCS en 2 mM EDTA bevat), centrifugeer gedurende 10 min. bij 400 g en resuspendeer tot een eindconcentratie van 500 μ l per 10^8 cellen met dezelfde buffer.

10 (x) Stel een MS^+/RS^+ -kolom samen in het magnetisch veld van de MACS-scheidingsinrichting. Wanneer de mononucleaire celhoeveelheid hoog is, gebruik dan twee MS^+/RS^+ -kolommen.

(xi) Was de kolom met 3 ml HBS (dat 2% FCS en 2 mM EDTA bevat).

(xii) Laat de cellen door de kolom en was vervolgens met

15 4 x 500 μ l HBSS (dat 2% FCS en 2 mM EDTA bevat).

(xiii) Elueer en verzamel de cellen in een conische buis, draai deze vervolgens af en resuspendeer deze in IMDM en plaats deze in een bloedzak zoals bij A (vi).

20 (D) FACSVantage-gezuiverde B-cellen:

(i) Verkrijg mononucleaire cellen uit perifere bloedmonsters van B-CLL-patiënten zoals hierboven bij A is beschreven.

(ii) Kleur deze cellen met een combinatie van CD19-PE en CD20-FITC-geconjugeerde monoklonale antilichamen om de B-cellen te

25 identificeren.

(iii) Sorteert op basis van de CD19/CD20-fluorescentie ongeveer 10^7 -cellen met een Beckton Dickinson FACS Vantage en een argon-laser die bij 488 nm emitteert.

(iv) Was de gezuiverde cellen met Hanks-gebalanceerde zoutoplossing die 50% FCS bevat en laat deze vervolgens gedurende de nacht bij 37°C in een vochtige incubator bij 5% CO₂ herstellen.

(v) Draai de cellen af en resuspendeer deze en plaats deze in een bloedzak, zoals hierboven in A (vi) is beschreven en behandel deze vervolgens zoals in B hierboven is beschreven met CR3/43.

35

BEREIDING VAN STAMCELLEN IN VOLLEDIG BLOED

Behandeling van cellen met zuiver CR3/43 (Dako) monoklonaal antilichaam in volledig bloed kan worden uitgevoerd in een inrichting volgens de uitvinding:

- (i) Kies patiënten met WBC-hoeveelheden van $30-200 \times 10^9/\ell$ (variërend van 73-95% B-lymfocyten).
- (ii) Verzameld bloed door een aderpunctie in citraat, EDTA- of conserveermiddelvrije heparinebevattende buizen en plaats het bloed
5 in een bloedzak. Bij voorkeur wordt het verzameld bloed direct gebruikt en op geschikte wijze binnen 6 uur na het verzamelen. Echter kan bloed dat is opgeslagen/ingevroren onder stikstof eveneens worden gebruikt na ontdooien.
- (iii) Plaats de bloedzak van (ii) dat het volledig bloed omvat
10 in de inrichting volgens de uitvinding.
- (iv) Een automatische differentiële witte-bloedceltelling wordt uitgevoerd met een Coulter-telinrichting. Patiënten met witte-bloedcelhoeveelheden van $30-200 \times 10^6$ per ml (waarvan 60-95% B-cellen zijn) worden met voorkeur geselecteerd.
- 15 (v) De levensvatbaarheid van het bloed kan automatisch worden bepaald, waarbij geschikte werkwijzen ofwel propidiumiodide en stroomcytometrie of tryptan-blauw en een hemocytometer na lyse van rode bloedcellen onder toepassing van een ammoniumchlorideoplossing omvatten.
- 20 (vi) CR3/43-antilichaam wordt aan een monster van volledig bloed in de kamer van de inrichting toegevoegd tot een eindconcentratie van $1-3 \mu\ell/10^6$ cellen (wanneer bijv. de WBC-hoeveelheid $50 \times 10^9/\ell$ bedraagt, dient $50 \mu\ell$ CR3/43 monoklonaal antilichaam, muisen-IgG-concentratie van $159 \mu\text{g}/\text{ml}$ per ml bloed te worden toegevoegd).
- 25 (vii) Meng bloed en antilichaam grondig met een peddel in de kamer van de inrichting en laat dit gedurende een vastgestelde tijdsduur, niet minder dan 2 uur, bij kamertemperatuur, bij voorkeur tussen 18°C en 37°C in de incubatiekamer staan.
- (viii) Analyseer de bloedcellen met stroomcytometrie, klonale
30 tests, lange-termijnkweek en/of PCT-analyse 0, 2, 6 en 24 uur na het toevoegen van monoklonale antilichamen onder toepassing van de volgmiddelen van de inrichting.
- Noot: Als gevolg van de homotypische aggregatie van B-cellen en de vorming van adherente cellen op de bodem van de testbuis, geïnduceerd
35 door het monoklonaal antilichaam CR3/43, dienen de cellen grondig te worden gemengd voorafgaand aan de analyse met pipetpuntjes met een grote opening.

Om gedurende de analyse een uniforme celpopulatie te verkrijgen dient het bloedmonster in afzonderlijke hoeveelheden in een aantal kamers te worden verdeeld voorafgaand aan de CR3/43-behandeling.

5 VOORBEREIDING VOOR DE ANALYSE VAN STAMCELLEN, GEVORMD DOOR HET
BEHANDELEN VAN GEKWEekte B-CELLEN MET CR3/43-MONOKLONAAL ANTILICHAAM

Stamcellen die zijn gevormd met de werkwijzen volgens de uitvinding kunnen op een aantal tijdstippen worden bepaald, bijvoorbeeld elke 2 uur, 7 uur, 24 uur, dagelijks, elke 7 dagen of langere perio-
10 den (maanden, na wekelijkse voeding van cellen met een lange-termijnkweekmedium). Een of meer behandelings- en controleputjes kunnen op elk tijdstip worden geanalyseerd, waarbij de resterende behandelings- en controleputjes op de volgende tijdperiode daarna worden geanalyseerd.

15 Deze bepaling kan eveneens automatisch worden uitgevoerd met behulp van volgmiddelen die zijn opgenomen in de inrichting volgens de uitvinding.

(i) Verwijder de niet-hechtende laag voorzichtig met een pipet met grote boring en verstoor celklompen door herhaaldelijke opzuiging
20 door een pipet met grote boring waarbij een enkele-celsuspensie wordt verkregen.

(ii) Schraap de hechtende laag met een celschaper en verstoor de celklompen voorzichtig voor het verkrijgen van een enkele celsuspensie door herhaaldelijke opzuiging door een pipet met grote boring.

25 (iii) Als alternatief, trypsiniseer de hechtende laag door eerst te spoelen met HBBS en door vervolgens 2 ml 0,5% trypsine per putje toe te voegen en incubeer gedurende 10 minuten bij 37°C.

(iv) Verstoor de celklompen voorzichtig door herhaaldelijk pipetteren met een pipet met grote boring.

30 (v) Incubeer na 10 min. met 20% FCS tot een eindconcentratie voor het inactiveren van het trypsine.

(vi) De kweekcellen die hierboven bij (ii) of (v) zijn verkregen kunnen wat betreft elk type (d.w.z. behandelde en niet-behandelde cellen) op elk tijdstip worden verzameld en gedurende 10 min. bij
35 400 g worden gecentrifugeerd.

(vii) Voor PCR-analyse (zie C) dient het afgedraaide celmateriaal (behandelde en niet-behandelde cellen), verkregen bij (vi) direct te worden gebruikt.

(viii) Voor een klonale testanalyse wordt het afgedraaide celmateriaal (behandelde en niet-behandelde cellen), hierboven verkregen bij stap (ii) of stap (vi) geresuspendeerd in IMDM dat 2% warmte-geactiveerd FCS bevat. Een klein gedeelte van de cellen kan worden verwijderd om de cellen te tellen en om hun levensvatbaarheid te bepalen met behulp van tryptan-blauw en een hemocytometer.

(ix) Voor FACs-analyse, resuspendeer het afgedraaid celmateriaal (behandelde en niet-behandelde cellen) hierboven verkregen bij stap (ii) of (v) in Hanks-gebalanceerde zoutoplossing (calcium- en magnesium-vrij) dat 2% warmte-geactiveerd FCS en 5 mM EDTA bevat.

ANALYSE VAN STAMCELLEN

De volgende werkwijzen kunnen worden gebruikt voor het bepalen van stamcellen. De inrichting volgens de uitvinding kan volgmiddelen omvatten voor het uitvoeren van de hieronder in detail beschreven werkwijzen of gedeelten daarvan.

(A) Immuunfenotype:

Voor immuunfenotypische analyse (met stroomcytometrie) voor volledige bloedmonsters:

- (i) Immuunkleuring (volgens de instructies van de fabrikant), lyseer de erythrocyten en was de cellen na de incubatieperiode en behandel deze met mAb. Typisch kunnen de lysis- en wasoplossingen van Bacton Dickinson worden gebruikt.
- (ii) Leukocyten (in volledig bloed, mononucleaire fractie, MACS-microbolletjes-negatief geselecteerde B-cellen of gesorteerde B-CLL) dienen te worden gemerkt met mAbs, die direct zijn geconjugeerd aan fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) of fyco-erythrine (PE).
- (iii) De merkerreeks die wordt gebruikt in de immuunfenotypische analyse kan er als volgt uitzien:

- CD38 PE + CD45 FITC + CD34 PE-Cy5
- CD19 PE + CD10 FITC + CD34 PE-Cy5
- CD117 PE + CD3 FITC + CD34 PE-Cy5
- CD33 PE + CD61 FITC + CD34 PE-Cy5
- Glycoforine A PE + CD71 FITC + CD34 PE-Cy5
- AC133 PE + CD90 FITC + CD34 PE-Cy5
- CD19 PE + CD5 FITC
- IgG1 PE + IgG1 FITC + IgG1 PE-Cy5 (isotype-negatieve controle)

(iv) Dubbele markering met de IMK+-set (Becton Dickinson) kan worden uitgevoerd: bestaande uit de volgende monoklonaal antilichaamparen:

5

- CD45-FITC en CD14-PE;
- CD19-PE en CD3-FITC;
- CD8-PE en CD4-FITC;
- HLA-DR-PE en CD3-FITC; en
- 10 • CD56, CD16-PE en CD3-FITC.

Eveneens zijn isotype-passing-negatieve controles voor IgG1-FITC en IgG2a-PE opgenomen.

(v) De volgende aanvullende antilichamen kunnen eveneens wor-

15 den gebruikt, die worden geproduceerd door Dako en Becton Dickinson:

PE-geconjugeerd: anti-CD8, anti-CD33, anti-CD13, anti-CD34, anti-CD19, anti-CD2, anti-CD14, anti-CD33 en anti-CD5;

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

20 (vi) De volgende kunnen eveneens worden gebruikt.

- Ook kan affiniteitsgezuiverd IgG3 en mAb, specifiek voor CD34 (Dako) worden gebruikt en wordt aangetoond met FITC- of PE-ge-
- merkt geiten-anti-muis-immunoglobuline F(ab)'₂-fragmenten als
- 25 secundair antilichaam (DAKO).
- Kwantum-rood (PE-Cy5)-geconjugeerd anti-CD34 (Dako) werd eveneens gebruikt.

(vii) Analyseer de cellen met een FACScan of FACS-Vantage

30 (Becton Dickinson) of elke andere stroomcytometer. Een gelijk aantal gebeurtenissen met 100.000 cellen dient te worden geanalyseerd en de tijd dient te worden genoteerd.

(viii) Analyseer de gegevens met Proprietary Paint-a-Gate-, Lysis II-, Consort 30- en CellQuest-software.

35 Voor immuunfenotypische analyse (met stroomcytometrie) van buffy-coat-monsters, bijvoorbeeld:

(i) Immuunkleur (volgens de instructies van de fabrikant), lyseer de erythrocyten en was de cellen na de incubatieperiode en behandel

deze met mAb. De lysis- en wasoplossingen van Becton Dickinson kunnen typisch worden gebruikt.

- (ii) Leukocyten dienen ofwel dubbel ofwel enkel te zijn gemarkeerd met mAbs, direct geconjugeerd met fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC),
5 fycoerythrine (PE) of RPE-Cy5.

De volgende gemerkte merkers kunnen op geschikte wijzen worden gebruikt: CD34 (stamcelmerker); CD19 (B-lymfocytmerker); CD45 (leukocytmerker); CD3 (T-lymfocytmerker); CD33 (myelocytmerker); CD71 (rodebloedcelmerker); CD61 (megakaryocytmerker); glycoforine A (rode-
10 bloedcelmerker); AC133 (stamcelmerker); CD38 (primitieve-stamcelmerker); CD90 (stamcelmerker); CD10 (lymfoïde stamcelmerker); CD117 (pluripotente stamcelmerker); IgG1 (negatieve controle).

(B) Morfologie

- 15 Voor morfologische analyse:

Lichtmicroscopie

- (i) Resuspendeer de cellen grondig in IMDM dat 2% warmtegeactiveerd FCS bevat met behulp van pipetpunten met een grote opening.
- 20 (ii) Onderzoek onder een Leitz-microscoop met een geschikte kleuringsoplossing, bijvoorbeeld kan de May-en-Greenwald-kleuringsoplossing (BDH Chemical Ltd.) gebruikt worden voor de analyse van myeloïde en lymfoïde cellen. De vakman kent andere kleuren die geschikt zijn voor de identificatie van andere kolonies, bijvoorbeeld
- 25 Wright's- of Giemsa-kleuringen.
- (iii) Morfologische analyse van B-CLL lymfocyten kan worden uitgevoerd in bloedfilms of in cyto-gecentrifugeerde preparaten.

Confocaalmicroscopie

- 30 (i) Verkrijg B-cellen zoals hierboven is beschreven (B-CLL of gezonde B-cellen die zijn verkregen uit een buffy-coat van gezonde bloeddonoren).
- (ii) Behandel B-cellen met monoklonaal antilichaam CR3/43 zoals hierboven is beschreven.
- 35 (iii) Voeg 2 ml celsuspensie toe aan een orgaankweekschaal (de bodem van deze schaal is zodanig vervaardigd dat deze een dekglasje heeft).

(iv) Voeg 15 µl monoklonaal antilichaam tegen CD19-FITC-conjugaat en 15 µl monoklonaal antilichaam tegen CD34 PE/Cy5-conjugaat (Quantum Red) toe.

(v) Gebruik propidiumiodide om de levensvatbaarheid te bepalen en Hoechst om de kernen te kleuren.

(C) PCR-analyse van de VDJ/JHF-genherschikking

Het VDJ- en/of JHF-gebied van het IgH-gen werd geanalyseerd met behulp van PCR (Perkin Elmer-thermokringloopapparaat) met matrijs-DNA van B-CLL-perifeer bloed en buffy-coat-monsters, voorafgaand en na (2 uur, 6 uur en 24 uur) behandeling met antilichaam. Dit protocol is aangepast van Stolc et al. (American Journal of Hematology 38:1-8; 1991). De JHF-primers worden gebruikt voor de positieve aantoning van het immuunglobuline-zware-keteng in de kiembaanconfiguratie. De JH6-primers worden gebruikt als positieve inwendige controle voor het immuunglobuline-zware-keteng. In B-cellen, leukemische alsmede in normale lymfocyten, is het JHF-gebied altijd verwijderd en kan derhalve niet worden geamplificeerd, terwijl het JH6-gen, een inwendige controle, intact blijft. Het β -actinegen werd als een controle gebruikt.

(i) . Isoleer genomisch DNA van volledig bloed met behulp van de Qiagen QiAmp Maxi-bloedset. Gebruik het maximale-opbrengst-protocol. Extraheer al het DNA van elk monster (behandeld en onbehandeld).

(ii) Laat onverdund en 1:5 verdund DNA op een 1,5% agarosegel lopen om de concentratie en de kwaliteit te bepalen.

(iii) PCR-verwarm 2-2 µl onverdund genomisch DNA-matrijs gedurende 5 minuten bij 96°C.

I) JH6a/JH6g JHF α /JHF γ

Bereid een "mastermengsel" dat voldoende is voor 4 patiënten (8 reacties behandeld en niet-behandeld) volgens de hieronder in detail beschreven tabel. Dit kan naar wens op grotere of kleinere schaal worden uitgevoerd.

	Volume/ μ l	[Eind]
Nuclease-vrij water	370	--
PCR 10 x Buffer	80	1x
*25 mM $MgCl_2$	64	2 mM
*5 mM dNTPs	128	0,8 mM
10 μ M P1	80	1 μ M
10 μ M P2	80	1 μ M
5 E/ μ l Taq pol.	2	10 eenheden

* Wervel de buisjes elk 2-3 keer gedurende 5 seconden voorafgaand aan gebruik om het monster te equilibreren.

5 Voeg een hoeveelheid van 95 μ l "mastermengsel" aan elke buis toe die gedenatureerd genomisch DNA bevat. Stel het thermokringloop-apparaat in op 1 min. 30 sec. op 95°C, 2 min. op 55°C, 1 min. 30 sec. op 72°C (35 kringlopen) en 5 min. op 72°C (1 kringloop).

10 II) β -actine

Bereid een "mastermengsel", dat voldoende is voor 8 reacties zoals hierboven bij I) is beschreven. Vergroot of verklein desgewenst de schaal.

	Volume/ μ l	[Eind]
Nuclease-vrij water	380	--
PCR 10 x Buffer	80	1x
*25 mM $MgCl_2$	48	1,5 mM
*5 mM dNTPs	128	0,8 mM
10 μ M P1	80	1 μ M
10 μ M P2	80	1 μ M
5 E/ μ l Taq pol.	2	10 eenheden

15

* Wervel de buisjes elk 2-3 keer gedurende 5 seconden voorafgaand aan gebruik om het monster te equilibreren.

20 Voeg 95 μ l "mastermengsel" toe aan elke buis die gedenatureerd genomisch DNA bevat. Stel het thermokringloopapparaat in gedurende 1 min. 30 sec. op 95°C, gedurende 2 min. op 55°C, gedurende 1 min. 30 sec. op 72°C (25 kringlopen) en 5 min. op 72°C (1 kringloop).

Primers voor PCR

De eerste set primers, ontworpen om een fragment van 240 bp van het IgH-JHF-gen te amplificeren was als volgt:

5 JHFa AAA GGT GCT GGG GGT CCC CTG
JHfb CCC AGT GCT GGA AGT ATT CAG C

De tweede set primers, ontworpen om een fragment van 242 bp te amplificeren van het IgH-JHF-gen waarbij gebied 6 was gekoppeld was
10 als volgt:

JH6a CAT TGT GAT TAC TAC TAC TAC TAC
JH6b GAT CCT CAA GGC ACC CCA GTG C

15 De derde set primers, ontworpen om een fragment van 249 bp van het β -actinegen te amplificeren was als volgt:

Beta ACT-1 AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT
Beta ACT-2 TCG GTG AGG ATC TTC ATG AG

20

(D) Southern-analyse van VDJ-genherschikking

(i) Digereer het genomisch DNA van behandelde en niet-behandelde perifere bloedmonsters van gezuiverde B-cellen (van B-CLL-patiënten) met *Bam*HI/*Hind*II - typisch zijn cellen van een aantal put-
25 jes nodig om een voldoende hoeveelheid DNA op te leveren om de analyse uit te voeren.

(ii) De digesten worden gescheiden op 0,8%'s agarosegel en overgebracht op GeneScreen® nylonmembranen (Dupont) volgens de instructies van de fabrikant (Southern, 1975).

30 (iii) De herschikking van het IgH-gen kan worden gekarakteriseerd door het analyseren van het J-gebied van de IgH-locus, onder toepassing van een met ³²P gemerkte menselijke JH-DNA-probe, die is geïsoleerd uit genomisch placenta-DNA (Calbiochem, Oncogene Science).

(iv) Autoradiogrammen dienen enkele dagen voorafgaand aan ont-
35 wikkeling bij -70°C te worden bewaard.

(E) Lange-termijnkweek

Celkweeken die zijn bereid zoals hierboven is beschreven kunnen gedurende langere perioden worden gehouden (lange-termijnkweek) door

deze wekelijks te voeden met een lange-termijnkweekmedium (Iscove's gemodificeerd Dulbeccos medium (IMDM - Gibco BRL Life Technologies Ltd.), 10% warmte-geactiveerd FCS, 10% warmte-geactiveerd paardenserum (HS), 1% hydrocortison, 1% penicilline/streptomycine 5×10^{-7} M voorraadoplossing).

(i) Als eerste verdunt men na een bepaald tijdstip, bijv. 24 uur vanaf het begin van CR3/43-behandeling, de cellen in elk putje door 2 ml lange-termijnkweekmedium toe te voegen.

(ii) Voed de cellen wekelijks na verwijderen van de helft van het groeimedium.

(iii) Inspecteer de putjes met fase-contrastmicroscopie.

(F) Klonale tests:

(i) Na elke tijdsperiode na het begin van een behandeling kan 300 μ l van de niet-hechtende cellen in kweekmedium zoals hierboven is beschreven worden verkregen.

(ii) Voeg aan de celsuspensie in bovenstaand kweekmedium 3 ml methocult GFG4434 (StemCell Technologies, bestaande uit methylcellulose in IMDM, FCS, BSA, L-glutamine, rh-stamcelfactor, rh-GM-CSF, rh-IL-3 en rh-erythropoietine) toe.

(iii) Neem 1,1 ml van het celmengsel en plaat dit in drievoud uit.

(iv) Incubeer de platen gedurende 14 dagen bij 37°C in een bevochtigde petrischaal met 5% CO₂ en 5% O₂.

(v) Inspecteer de putjes voorafgaand aan en na behandeling met CR3/43-monoklonaal antilichaam onder toepassing van fase-contrastmicroscopie.

(vi) Na 14 dagen kunnen de cellen (kolonieën) worden geanalyseerd door stroomcytometrie, convocale microscopie en/of PCR.

(vii) Wanneer de klonale test wordt uitgevoerd dient alcoholverneveling te worden vermeden, omdat dit celklompen of afbraak tot gevolg heeft, hetgeen de overleving van beide celtypen (behandeld en niet-behandeld) negatief beïnvloedt.

35 B. RESULTATEN

CD19- EN CD3-REEKS

Behandeling van bloedmonsters in de inrichting volgens de uitvinding met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen doet altijd het relatieve aantal

CD19⁺-cellen afnemen. Deze merker is een pan-B-cel-antigen (zie tabellen). Dit antigen is op alle menselijke B-lymfocyten gedurende alle rijpingsstadia aanwezig, maar gaat verloren op de uiteindelijke gedifferentieerde plasmacellen. Derhalve is dit een indicatie dat B-
5 cellen teruggedifferentiëren tot ongedifferentieerde cellen.

Dezelfde behandeling veroorzaakte een dramatische toename van het relatief aantal CD3⁺-cellen, in het bijzonder in bloed van patiënten met B-CLL, hetgeen altijd gepaard ging met een toename in het relatieve aantal CD3⁺CD19⁻-cellen. CD3 is aanwezig op alle rijpe T-
10 lymfocyten en op 65%-85% van de thymocyten. Deze merker wordt altijd samen met α -/ β - of gamma-/delta-celreceptoren (TCR) aangetroffen en gezamenlijk zijn deze complexen belangrijk voor signaaltransductie naar het inwendige van de cel. Derhalve is dit een indicatie dat B-
cellen teruggedifferentieerden tot ongedifferentieerde cellen en zich
15 vervolgens toewijdden tot nieuwe gedifferentieerde cellen, namelijk T-cellen.

Een nieuwe kloon van cellen verscheen in behandeld bloed van B-CLL-patiënten die de CD19- en CD3-merkers tot expressie brachten - d.w.z. CD19⁺- en CD3⁺-cellen (zie kaart 1, patiënt 2, 3 & 4 op 2
20 uur, 6 uur & 24 uur na het starten van de behandeling), welke behandeling kan worden uitgevoerd in de inrichting volgens de uitvinding. Andere patiënten met andere aandoeningen vertoonden een toename in het relatieve aantal van deze celklonen. Deze cellen waren uitzonderlijk groot en in grote mate gegranuleerd en uitermate hoge hoeveelheden CD19 werden op hun celmembraan tot expressie gebracht. De CD3-
25 merker schijnt op deze cellen in vergelijkbare hoeveelheden tot expressie te worden gebracht als die, welke op normale rijpe lymfocyten tot expressie wordt gebracht.

In Tabel 2, patiëntnummers 2, 3 en 4 zijn feitelijk getallen
30 die dezelfde patiënt vertegenwoordigen en zij zijn genoemd om het effect van de behandeling van bloed in de tijd te tonen (zie Tabel 1 voor de experimentele en klinische toestand van deze patiënt).

De CD19⁺CD3⁺-klonen in behandelde monsters schijnen in de tijd af te nemen, waarbij oorspronkelijke hoeveelheden worden bereid van
35 die, welke zijn bepaald in het onbehandelde monster op 2 uur, 6 uur en 24 uur.

Een ander type cel van dezelfde grootte en granulair karakter werd aangetoond in behandelde monsters en deze cellen hadden hoge hoeveelheden CD19 dat op hun oppervlak tot expressie werd gebracht,

maar zij waren negatief voor de CD3-merker en rijk aan FC-receptoren. Het relatieve aantal van deze cellen scheen echter in de tijd af te nemen. Belangrijk was bij 24 uur behandeling van het bloedmonster (2, 3 en 4) een afname in het relatieve aantal CD19⁻CD3⁻-cellen in een
5 groep cellen waarvan men aanvankelijk had waargenomen dat deze 2 en 6 uur na behandeling van de bloedmonsters toenamen. Echter waren de Coulter-telwaarden van de WBC-populaties lager bij behandeling van bloed met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen. Deze vinding suggereert dat dit type
10 behandeling leidt tot atypische cellen die niet kunnen worden aangetoond door Coulter (Tabel 1), maar kunnen worden waargenomen wanneer zij worden gemeten met stroomcytometrie, waarbij cellen worden geteld op basis van de oppervlaktemerkers, grootte en granulair karakter. Voorts werden deze atypische cellen waargenomen door het analyseren
15 van de morfologie met behulp van Wright's-kleuring onder een microscoop. Stroomcytometriekaarten van deze fenomenen zijn weergegeven in Kaarten (1, 2, 3 & 4) en de immuunfenotypische veranderingen die worden verkregen bij de behandeling van bloedmonsters lijken te suggereren dat CD19⁺- en CD3⁺-lymfocyten een met elkaar verbonden groep cellen zijn, maar verschillend blijven op basis van de relatieve expres-
20 sie van CD19 en CD3 in vergelijking met stamcellen.

In Tabel 2 vertegenwoordigen patiëntnummers 5 en 6 dezelfde patiënt, maar de analyse van behandelde en onbehandelde bloedmonsters werden in de tijd en op hetzelfde moment bekeken (Tabel 1).

25 Patiëntenbloed zonder B-celkwaadaardigheid vertoonde dezelfde neigingen tot immuunfenotypische wijzigingen in vergelijking met bloed van B-CLL-patiënten, maar de wijzigingen waren niet van dezelfde omvang. Echter is het relatieve en absolute aantal B-lymfocyten en MHC-klasse II-positieve cellen in het bloed van deze patiënten
30 extreem laag in vergelijking met die, welke worden gevonden in het bloed van B-CLL-patiënten.

Twee broers met beide X-gekoppelde infantiele hypogammaglobulinemie die B-celdeficiënt waren vertoonden verschillende immuunfenotypische wijzigingen in het relatieve aantal CD3⁺-cellen bij behande-
35 ling van hun bloed. De jongere broer was 2 maanden oud en niet ziek en vertoonde van behandeling van zijn bloed een lichte toename in het relatieve aantal CD3⁺-cellen, hetgeen gepaard ging met een afname van het relatieve aantal CD3⁻CD19⁻-cellen. Anderzijds vertoonde de andere broer, die 2 jaar oud was en uitermate ziek was en een relatief hoog

aantal geactiveerde T-cellen bezat die DR-antigenen tot expressie brachten, een afname in het aantal CD3⁺-cellen bij behandeling van zijn bloed. Er werden geen andere merkers gebruikt om andere immuunfenotypische wijzigingen te meten die plaats hadden kunnen vinden, 5 omdat de bloedmonsters die van deze twee patiënten was verkregen uitermate klein waren (Tabel 2, ID 43/BD en 04/BD).

Patiënt 91 in Tabel 2 toont een afname in het relatieve aantal CD3⁺-cellen na behandeling van het bloed, hetgeen gepaard ging met een toename van het relatieve aantal CD3⁻CD19⁻-cellen. Echter nam men 10 bij analyse van andere oppervlakmerkers, zoals CD4 en CD8 (zie Tabel 3) waar dat de patiënt een relatief hoog aantal CD4⁺CD8⁺-cellen in zijn bloed had en dit werd waargenomen voorafgaand aan de behandeling van bloedmonsters met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het DR-antigen en deze dubbele positieve cellen namen aanzienlijk af 15 na behandeling van het bloed. Voorts bleek het relatieve aantal CD3⁺-cellen te zijn verhoogd wanneer andere merkers werden geanalyseerd (zie Tabel 4).

Een verrijkt preparaat van B-lymfocyten, verkregen van gezonde bloeddonoren vertoonde, wanneer dit werd behandeld met monoklonaal 20 antilichaam tegen de β -keten van DR-antigenen in een inrichting volgens de uitvinding een dramatische toename in het relatieve aantal CD3⁺-cellen, hetgeen altijd gepaard ging met een toename van het relatieve aantal CD19⁺-cellen en met een toename in het relatieve aantal CD19⁻CD3⁻-cellen. Verdere analyse met merkers zoals CD4 en CD8 25 vertoonde een gelijktijdige toename van het relatieve aantal van deze merkers. Echter vertoonde een verrijkt preparaat van T-lymfocyten van dezelfde bloeddonoren, wanneer deze met hetzelfde monoklonaal antilichaam werd behandeld niet dezelfde wijzigingen.

30 CD4- EN CD8-REEKS

Het CD4-antigen is de receptor voor het menselijk immuundeficiëntievirus. Het CD4-molecuul bindt MHC-klasse II-antigen in het B2-domein, een gebied dat lijkt op de CD8-bindingsplaatsen op klasse I-antigenen. Binding van CD4 aan klasse II-antigen verhoogt de bereid- 35 heid van T-cellen tot een respons op antigenen en hetzelfde gebeurt bij CD8 ten opzichte van de klasse I-antigenen. De CD8-antigenen zijn aanwezig op een subreeks van menselijke suppressor/cytotoxische T-lymfocyten, alsmede op een subreeks van natuurlijke killer(NK)lymfocyten en bij de meerderheid van normale thymocyten. De

CD4- en CD8-antigenen worden op thymocyten gezamenlijk tot expressie gebracht en deze cellen verliezen beide merkers wanneer zij tot T-lymfocyten rijpen.

Bij de analyse van CD4- en CD8-merkers - zie hieronder - en bij
5 de meerderheid van bloedmonsters die zijn weergegeven in Tabel 2 verschijnt een kleuringspatroon dat de aanwezigheid van een teruggedifferentiatieproces van B-lymfocyten tot ongedifferentieerde cellen en de daaropvolgende differentiatie tot T-lymfocyten ondersteunt.

CD4⁺CD8⁺-cellen, die dubbel-positieve cellen zijn, verschenen
10 altijd na behandeling van bloedmonsters met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten en deze celtypen namen aanmerkelijk toe in het bloed van behandelde monsters van patiënten met B-CLL en waren in het geheel afwezig in onbehandelde monsters (zie Tabel 3 en Kaarten 1, 2, 3 & 4). In dezelfde monsters werd eveneens
15 een gelijktijdige toename van het relatieve aantal van enkel-positieve cellen zoals CD8⁺- en CD4⁺-cellen waargenomen. Voorts werd een afname van het relatieve aantal CD4⁺CD8⁻-cellen, die ten minste in het geval van B-CLL overeenkomen met B-cellen, waargenomen, die dramatisch daalde in behandelde monsters in vergelijking met onbehandelde
20 monsters die dezelfde hoeveelheid behielden wanneer deze in de tijd werden gemeten. Echter vertoonde de meting van het relatieve aantal CD4⁺CD8⁺-cellen in de tijd in behandelde monsters dat er een gelijktijdige toename in het aantal van enkel-positieve cellen was, bij een afname in het relatieve aantal van dubbel-positieve cellen. Dit type
25 van immuunfenotypeverandering is kenmerkend voor de ontwikkeling van voorlopercellen van de T-lymfocytlijn in de thymus (Patiënt nummer 2, 3 en 4). Het CD4-antigen is aanwezig op de helper/inducer T-lymfocytsubreeks (CD4⁺CD3⁺) en op de meerderheid van normale thymocyten. Dit antigen is echter met een lage dichtheid aanwezig op het celoppervlak
30 van monocytten en in het cytoplasma van monocytten en macrofagen (CD3⁻CD4⁺).

Het relatieve aantal CD4⁺-laag-cellen werd in verschillende bloedmonsters na behandeling in de inrichting volgens de uitvinding verschillend beïnvloed. Het relatieve aantal van dit type cellen
35 scheen onbeïnvloed te blijven in bloedmonsters van patiënten met B-CLL na behandeling in vergelijking met onbehandelde monsters. Dergelijke lage hoeveelheden van CD4-expressie wordt aangetroffen bij monocytten en zeer vroege thymocyten.

Patiënt HIV⁺25 vertoonde bij de behandeling een aanzienlijke toename in het aantal dubbel-positieve cellen die gelijktijdig CD4 en CD8 tot expressie brachten. Anderzijds vertoonde patiënt 91 bij behandeling een afname van dit subtype cellen en de waarneming van een dergelijk fenomeen is tijdsafhankelijk. Men nam waar dat het relatieve aantal CD8⁺-cellen toenam in onbehandelde bloedmonsters van patiënten met B-CLL wanneer dit in de tijd werd gemeten, terwijl men waarnam dat het relatieve aantal CD4⁺- en CD4⁺-laag-cellen op dezelfde tijdstippen afnam (Tabel 3, patiënt 2, 3 en 4).

10

DR- EN CD3-REEKS

De DR-merkers zijn aanwezig op monocyten, dendritische cellen, B-cellen en geactiveerde T-lymfocyten.

Behandelde en onbehandelde monsters die met deze reeks zijn geanalyseerd vertoonden immuunfenotypische veranderingen die leken op die, welke waren verkregen wanneer bloedmonsters werden geanalyseerd met de CD19- en CD3-merkers (zie Tabel 2) en deze antigenen zijn, zoals eerder is genoemd, respectievelijk pan-B- en T-celmerkers.

Behandeling van bloed in een inrichting volgens de uitvinding met monoklonale antilichamen blijkt het relatieve aantal DR⁺B-lymfocyten zodanig te beïnvloeden dat de hoeveelheid DR⁺-cellen afneemt. Daarentegen neemt het relatieve aantal CD3⁺(T-cellen)cellen significant toe (zie Tabel 4 ende Kaart). Voorts nam het relatieve aantal geactiveerde T-cellen toe in de meerderheid van de behandelde bloedmonsters van patiënten met B-CLL en deze typen cellen werden op variabele wijze in behandelde monsters van patiënten met andere aandoeningen beïnvloed.

Voorts bleek het relatieve aantal hoog-DR-positieve cellen significant hoog te zijn in behandelde monsters dan patiënten met B-CLL en in een 6 dagen oude baby met toegenomen DR⁺CD34⁺-uitbarstingen in zijn bloed. Echter dient te worden opgemerkt dat de uitbarstingen die in het bloed van deze patiënt aanwezig waren negatief waren voor T- en B-celmerkers voorafgaand en na behandeling, maar positiever werden voor de myeloïdelijn-antigenen na behandeling. Het relatieve aantal CD3⁻DR⁻-cellen nam in de meerderheid van behandelde bloedmonsters toe en was evenredig met toenames in het relatieve aantal CD3⁺-cellen (T-cellen) en was omgekeerd evenredig met de afnamen in het relatieve aantal DR⁺-cellen (B-cellen).

CD56&16- EN CD3-REEKS

De CD56&CD16-merkers worden aangetroffen op een heterogene groep cellen, een subreeks van lymfocyten die algemeen bekend zijn als grote granulaire lymfocyten en natuurlijke killer(NK)lymfocyten.

5 Het CD16-antigen wordt op nagenoeg alle resterende NK-lymfocyten tot expressie gebracht en wordt zwak tot expressie gebracht in sommige CD3⁺-T-lymfocyten in bepaalde individuen. Dit antigen wordt in een lagere hoeveelheid aangetroffen op granulocyten en is geassocieerd met lymfocyten die grote azurofiele granula bevatten. Het CD16-anti-
10 gen is de IgG-FC-receptor III.

Een variabel aantal CD16⁺-lymfocyten brengt ofwel het CD47-antigen of het lage-dichtheids-CD8-antigen of beide gezamenlijk tot expressie. In de meeste individuen is er nagenoeg geen overlap met andere T-lymfocyt-antigenen, zoals de CD5-, CD4- of CD3-antigenen. Het
15 CD56-antigen is aanwezig op in hoofdzaak alle resterende en geactiveerde CD16⁺-NK-lymfocyten en deze subreeksen van cellen voeren een niet-major histocompatibilitycomplex-beperkte cytotoxiciteit uit.

Immuunfenotypering van behandelde en onbehandelde bloedmonsters van B-CLL en sommige andere patiënten met andere aandoeningen ver-
20 toonden een toename in het relatieve aantal cellen die de CD56&CD16-antigenen gezamenlijk tot expressie brachten, die in grote aantal granula bevatten en van gemiddelde grootte waren (zie Tabel 5 en Kaarten 1, 2, 3 & 4). Deze waarnemingen gingen eveneens gepaard met een aanmerkelijke toename van het relatieve aantal cellen die slechts
25 het CD3-antigen tot expressie brachten (zonder de expressie van CD56- en CD16-merkers) en van cellen die de CD56&CD16- en CD3-merkers gezamenlijk tot expressie brengen.

In Tabel 5 vertegenwoordigen patiëntnummers 2, 3 en 4 hetzelfde bloedmonster, maar zijn geanalyseerd op respectievelijk de tijdstip-
30 pen 2 uur, 6 uur en 24 uur (voorafgaand en na behandeling). Dit monster laat zien dat behandeling van bloed met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het DR-antigen een spontane vorming van CD56⁺- en CD16⁺-cellen, van CD3⁺-cellen en CD56⁺- en CD16⁺CD3⁺-cellen te veroorzaken en deze waarnemingen gingen altijd
35 gepaard met het verdwijnen van B-celmerkers (CD19, DR, CD56, CD16⁻CD3⁻).

Verdere analyse van dit bloedmonster voorafgaand aan en na behandeling toonde dat de hoeveelheden CD56⁺- en CD16⁺-cellen in de tijd afnam en dat de hoeveelheid CD3⁺-cellen in de tijd toenam.

Bloedmonsters van patiënt 7 met B-CLL vertoonde geen enkele verandering in het aantal cellen dat CD56- CD16 - en CD3-antigenen tot expressie brachten in vergelijking met de immuunfenotypische veranderingen die werden waargenomen in behandelde en onbehandelde monsters en de reden hiervoor was dat de hoeveelheid monoklonaal antilichaam dat was toegevoegd extreem laag was ten opzichte van het aantal B-lymfocyten. Behandeling van het bloedmonster van deze patiënt op een ander moment met een geschikte hoeveelheid monoklonaal antilichaam vertoonde echter significante toenames in het relatieve aantal van CD3⁺-, CD56⁺- & CD16⁺-en CD56⁺- en CD16⁺CD3⁺-cellen.

Bloedmonsters van andere patiënten met andere aandoeningen vertoonden variabele wijzigingen in de hoeveelheid van deze cellen en dit lijkt afhankelijk te zijn van het aantal B-lymfocyten die aanwezig zijn in het bloed voorafgaand aan behandeling, van de duur van de behandeling en waarschijnlijk van de klinische toestand van de patiënten.

CD45- EN CD14-REEKS

Het CD45-antigen is aanwezig op alle menselijke leukocyten, inclusief lymfocyten, monocyten, polymorfonucleaire cellen, eosinofielen en basofielen in perifere bloed, de thymus, milt en amandelen en leukocytenvoorlopers in het beenmerg.

CD14 is aanwezig op 70-93% van normale monocyten in perifere bloed, 77-90% van pleurale of peritoneale vloeistof-fagocyten. Het antigen wordt zwak op granulocyten tot expressie gebracht en bestaat niet op ongestimuleerde lymfocyten, mitogeen-geactiveerde T-lymfocyten, erythrocyten of plaatjes.

Het CD45-antigen vertegenwoordigt een familie van eiwit-tyrosinefosfatasen en dit molecuul gaat een wisselwerking aan met externen stimuli (antigenen) en bewerkstelligt een signaaltransductie via de leden van de Scr-familie, hetgeen leidt tot de regulatie van celgroei en differentiatie.

De rol van de β -keten van de DR-antigenen in behandelde bloedmonsters, in het bijzonder die, verkregen van patiënten met B-CLL, suggereert dat een dergelijke behandeling de hoeveelheid CD4-antigenen op B-lymfocyten beïnvloedt. De totale immuunfenotypische veranderingen die plaatsvonden bij stimulatie van de β -keten van het DR-antigen schijnt te leiden tot verschillende typen cellen die gescheiden kunnen worden op basis van de hoeveelheid CD45- en CD14-expressie

alsmede op basis van morfologie, zoals bepaald door voorwaarts-scatter en zijwaarts-scatter (respectievelijk grootte en granulair karakter) en deze resultaten zijn weergegeven in Tabel en Kaarten (1, 2, 3 & 4). Zie eveneens fig. 7, waarin het verschijnen van CD45⁺CD14⁺-cellen na behandeling met CR3/43-antilichaam wordt getoond. Deze cellen zijn geen hematopoietische cellen.

Door behandeling in de inrichting volgens de uitvinding nam het relatieve aantal van CD45-laag-cellen (in vergelijking met onbehandelde monsters significant toe, hetgeen eveneens gold voor het relatieve aantal cellen dat CD45- en CD14-antigenen beide tot expressie brengt. Dit type immuunfenotypische veranderingen ging gepaard met een afname van het relatieve aantal CD45-hoog-cellen (in vergelijking met onbehandelde monsters). Echter kan laatstgenoemde celpopulatie verder worden verdeeld op basis van morfologie en de mate van CD45-expressie. Eén type was uitermate groot en had uitermate hoge hoeveelheden CD45-antigen in vergelijking met de rest van de in de kaarten aanwezige cellen (zie Kaarten 1, 2, 3 en 4). Analyse van deze reeks na behandeling in de tijd (zie Tabel 6, patiënt 2, 3 en 4 en Kaart 1) bleek het relatieve aantal CD45⁺-cellen aanvankelijk drastisch te dalen in de tijd, hetgeen CD45-laag-cellen tot gevolg had. Echter vertoonde een analyse van bloed 24 uur later de tegengestelde situatie.

Monsters 5 en 7 brachten immuunfenotypische wijzigingen aan het licht, die tegengesteld waren aan die welke waren verkregen met andere monsters die waren verkregen uit andere B-CLL patiënten en de reden hiervoor is dat de monsters op een veel vroegere incubatietijd met het monoklonaal antilichaam waren geanalyseerd. In feite lijkt de opeenvolgende analyse van bloedmonsters na behandeling te suggereren dat de immuunfenotypische wijzigingen, ondernomen door B-lymfocyten, tijdsafhankelijk is omdat het een ontwikkelingsstadium vertegenwoordigt en de immuunfenotypische wijzigingen die zijn gemeten op moment X zijn niet hetzelfde op het tijdstip X-plus (deze staan niet vast wanneer inductie heeft plaatsgevonden). Deze typen wijzigingen moeten echter op een striktere wijze in het lichaam plaatsvinden omdat anders immuunpathologie volgt. Het effect van de behandeling van bloedmonsters van andere patiënten zonder B-cel-kwaadaardigheid vertoonde variabele wijzigingen in de immuunfenotypen van de cellen vanwege het feit dat B-lymfocyten in een lagere hoeveelheid aanwezig waren. Echter vertoont de behandeling van verrijkte fracties B-lymfocyten die

zijn verkregen van gezonde bloeddonoren vergelijkbare immuunfenotypische veranderingen met die, welke zijn verkregen met B-CLL met hoge B-lymfocytaantallen.

5 CD8- EN CD3-REEKS

De antigene CD8-determinant gaat een wisselwerking aan met klasse I-MHC-moleculen, hetgeen leidt tot een verhoogde adhesie tussen CD8⁺-T-lymfocyten en de doelwitcellen. Dit type wisselwerking versterkt de activering van rustende lymfocyten. Het CD8-antigen is
10 gekoppeld aan een eiwit-tyrosinekinase (p56lck) en op zijn beurt kan het CD8/p56lck-complex een rol spelen in de activering van T-lymfocyten.

Behandeling van bloedmonsters in de inrichting volgens de uitvinding, verkregen van patiënten met B-CLL met monoklonaal antilichaam tegen de B-keten veroorzaakt een significante toename van het
15 relatieve aantal CD3CD8- en CD3- (dat zeer waarschijnlijk CD4CD3 is)-positieve cellen, hetgeen duidelijker aangeeft dat dubbel-positieve cellen die aanvankelijk zijn gevormd een ontwikkeling ondergaan tot rijpe T-lymfocyten. Dit is een proces dat direct genezen kan worden
20 met CD19 en met DR, en indirect met CD8⁺CD3⁺-antigenen. Seriële bepaling van behandelde bloedmonsters van dezelfde patiënt in de tijd blijkt in overeenstemming te zijn met een proces dat identiek is aan de thymocytenontwikkeling (Tabel 7, patiënt 2, 3 en 4 en Kaart 1).

Het relatieve aantal CD8⁺-cellen nam in behandelde en onbehandelde monsters in de tijd toe, maar dit was bij onbehandelde monsters hoger. Anderzijds nam het relatieve aantal CD8⁺CD3⁺-cellen in de tijd in onbehandelde monsters af. Echter nam het relatieve aantal CD3⁺-cellen in behandelde bloedmonsters toe, wanneer dit in de tijd werd gemeten en deze celtypen komen in hoge mate overeen met CD4⁺CD3⁺-en-
30 kel-positieve cellen; een rijpingsproduct van thymocyten. Omdat deze monsters eveneens werden immuunfenotypeerd met andere reeksen (hierboven genoemd in Tabellen 3, 4, 5 en 6) duiden de totale wijzigingen in zeer sterke mate op de rol van B-cellen in de vorming van T-lymfocyt-voorlopers en -nakomelingen.

35 Bloedmonsters van een patiënt met B-CLL (nummer 2, 3 en 4, Tabellen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) werden in aparte hoeveelheden behandeld met niets, PE-geconjugeerd monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de B-keten van DR-antigen en met een ongeconjugeerde vorm van hetzelfde monoklonale antilichaam. Bij een vergelijking kon men

duidelijk aantonen dat PE-geconjugeerde behandeling geen wijziging van het relatieve aantal CD3-positieve cellen en daarmee geassocieerde merkers, zoals CD4 met zich meebrengt, hetgeen wel in significante hoeveelheden werd waargenomen wanneer hetzelfde bloedmonster werd behandeld met een ongeconjugeerde vorm van het antilichaam. Echter werd een toename van het aantal CD45-positieve cellen zonder dat DR-antigen op hun oppervlak tot expressie werd gebracht waargenomen wanneer men dit in de tijd mat (zie Tabel 8). Deze vinding was vergelijkbaar met die welke was waargenomen in onbehandelde monsters wanneer deze werden immuunefenotyperd in de tijd (Tabel 6). Voorts nam het relatieve aantal cellen dat CD45-laag tot expressie brachten in de tijd af, een fenomeen dat eveneens werd waargenomen bij onbehandelde monsters (wanneer in de tijd werd gemeten) van dezelfde patiënt (zie Kaart 1A).

15

FAC-ANALYSE VAN CELLEN, AFKOMSTIG VAN MENSELIJKE BUFFY-COAT-MONSTERS

Behandeling van buffy-coat-monsters in een inrichting volgens de uitvinding met CR3/43-monoklonaal antilichaam leidde tot een hoger voorkomen van CD34 (stamcelmerker) en een lager voorkomen van CD19 (B-lymfocytmerker) - zie Tabel 21.

Kolonievormende tests brachten aan het licht dat in de onbehandelde monsters de overheersende kolonievormende cellen van het erythroidtype waren, terwijl de variatie in kolonietype in de behandelde monsters veel groter was, waarbij het belangrijkste kolonietype pluripotente celkolonievormende cellen waren, waarbij granulocyten/macrofagen en megakaryocyten, samen met erythroid-kolonievormende eenheden eveneens werden waargenomen.

Deze resultaten tonen dat de behandelde cellen veel beter in staat zijn langs andere lymfohematopoietische ketens te differentiëren, hetgeen tot diverse gespecialiseerde cellijnen leidt.

C. VERGELIJKING VAN HET EFFECT VAN ANDERE MONOKLONALE ANTILICHAMEN MET VERSCHILLENDE SPECIFICITEIT OP T-LYMFOPOIIESE

CD19- EN CD3-REEKS

Behandeling van bloedmonsters in een inrichting volgens de uitvinding met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de α -keten van het DR-antigen en het homologe gebied van MHC-Klasse I-antigenen deed het aantal CD3⁺-cellen afnemen en het aantal CD19⁺-cellen toenemen. Behandeling van hetzelfde bloed met monoklonaal an-

tilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het DR-antigen deed het aantal CD19⁺-cellen toenemen en het aantal CD3⁺-cellen afnemen. Behandeling met laatstgenoemd monoklonaal antilichaam met cyclofosfoamide leverde hetzelfde effect op (Tabel 14, patiënt 5/6 met
5 B-CLL bij 2 uur behandeling).

Verdere analyse van CD19⁺- en CD3⁺-cellen in dezelfde monsters bracht verdere toenames van het relatieve aantal CD3⁺-cellen alleen in bloed aan het licht dat behandeld was met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van DR-antigen (Tabel 14,
10 patiënt 5/6, 24 uur na behandeling. Verdere analyse (24 uur later, patiënt 5/6, Tabel 14) van bloedmonsters, behandeld met cyclofosfamide plus monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van DR-antigen toonde echter een omkering van het relatieve aantal CD19⁺- en CD3⁺-cellen in vergelijking met hetgeen is waargenomen bij 2 uur incubatie-
15 tietijd onder exact dezelfde omstandigheden.

Over het algemeen vertoont behandeling van bloedmonsters van dezelfde patiënt met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de α -keten van het DR-antigen of monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de α -keten van het klasse I-antigen een
20 toename in het relatieve aantal CD19⁺-cellen (pan-B-merker) in vergelijking met onbehandeld monster. Het relatieve aantal CD19⁺CD3⁺-cellen nam enigszins af in bloedmonsters die behandeld waren met monoklonaal antilichaam tegen de α -keten van DR-antigen of behandeld met monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigenen (zie Tabel 14 &
25 Kaarten 2, 3 & 4). Behandeling van bloedmonsters van patiënt 09 met monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigenen deed het relatieve aantal CD3⁺-cellen toenemen en het relatieve aantal CD19⁺- en CD19⁺CD3⁺-cellen enigszins afnemen. Echter vertoonde behandeling van een verrijkt preparaat B-lymfocyten, verkregen van gezonde bloeddonoren,
30 ren, met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten of α -keten van DR-antigen vergelijkbare immuunfenotypische veranderingen met die, welke waren verkregen met een patiënt met B-CLL.

Behandeling van HIV⁺ en IgA-deficiënte patiënten met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het DR-antigen deed het relatieve
35 tieve aantal CD3⁺-cellen toenemen en het relatieve aantal CD19⁺-cellen afnemen. Behandeling van hetzelfde bloedmonster met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van klasse I-antigen leverde echter niet hetzelfde effect. Behandeling van bloedmonsters, verkregen uit patiënten (34/BD en 04/BD) met B-cell-deficiëntie vertoonde

variabele immuunfenotypische veranderingen, wanneer deze waren behandeld met monoklonale antilichamen tegen de β -keten van het DR-antigen, klasse I-antigenen en CD4-antigen.

5 CD4- EN CD8-REEKS

Bloedmonsters die waren geanalyseerd met de CD19- en CD3-reeks (Tabel 14) werden eveneens immuunfenotypeerd met de CD4- en CD8-reeks (Tabel 15). Beide reeksen schijnen met elkaar in overeenstemming te zijn en elkaar te bevestigen. Incubatie van bloedmonsters van patiënten met B-CLL gedurende 2 uur (Tabel 15, patiënten 5/6 en 10, Kaarten 2, 3 & 4) met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de B-keten van het DR-antigen of met dit monoklonaal antilichaam plus cyclofosfoamide deed het relatieve aantal CD8⁺- en CD4⁺- en cellen die beide merkers tot expressie brachten toenemen. Anderszijds leverde behandeling van dezelfde monsters met monoklonale antilichamen tegen het homologe gebied van de α -keten van het DR-antigen of het homologe gebied van de α -keten van klasse I-antigen niet dezelfde effecten.

Vergelijking van de immuunfenotypische gegevens die waren verkregen bij incubatieperioden van 2 en 24 uur met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van DR-antigen plus cyclofosfoamide bracht omgekeerde wijzigingen in het relatieve aantal CD4- en CD8-positieve cellen aan het licht (Tabel 15, patiënt 5/6 met B-CLL en 2 uur en 24 uur) en dergelijke wijzigingen waren in overeenstemming met die, welke waren verkregen wanneer dezelfde bloedmonsters werden geanalyseerd met de CD19- en CD3-reeks (Tabel 14, dezelfde patiënt). Latere gegevens gaven aan dat de daaropvolgende differentiatie omkeerbaar is omdat de ongedifferentieerde cellen tot T-lymfocyten of B-lymfocyten kunnen differentiëren.

30

DR- EN CD3-REEKS

De immuunfenotypische wijzigingen die verkregen werden met de DR- en CD3-reeks (Tabel 16) bevestigen de vindingen die waren verkregen met de CD19- en CD3-reeks en de CD4- en CD8-reeks (Tabellen 14 & 15 en Kaarten 2, 3 & 4) die volgden op behandeling van dezelfde bloedmonsters met monoklonale antilichamen tegen het homologe gebied van de β - of α -zijde van het DR-antigen of monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigenen of monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het DR-antigen plus cyclofosfoamide bij een analyse van 2 uur.

Uit de resultaten blijkt dat het monoklonale antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het DR-antigen uitermate goed in staat is de vorming van CD3-positieve cellen van DR⁺-cellen te sturen.

5 Voorts bevorderden behandelingen zoals die waarin aangrijpen van de α -keten van DR-antigenen of aangrijpen van de β -kant van het molecuul in samenwerking met cyclofosfoamide (verlengde incubatietijd) toenamen in het relatieve aantal CD19⁺-cellen of DR⁺-cellen.

10 CD56&16- EN CD3-REEKS

Behandeling van bloedmonsters in een inrichting volgens de uitvinding, in het bijzonder van die van patiënten met B-CLL met hoge B-lymfocytaantallen, met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het DR-antigen deed het relatieve aantal van
15 CD56&16-positieve cellen toenemen.

In deze patiënten nam het relatieve aantal CD3⁺- en C56⁺- en CD16⁺CD3⁺-cellen eveneens toe na behandeling van bloedmonsters met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten, hetgeen eerdere waarnemingen bevestigden van dezelfde behandeling waarbij dezelfde bloedmonsters werden geanalyseerd met de CD3- en CD19- en de DR- en CD3-reeksen.
20

CD45- EN CD14-REEKS

Bloedmonsters, behandeld in een inrichting volgens de uitvinding met monoklonale antilichamen tegen de β - of α -ketens van het DR-antigen of tegen de β -keten plus cyclofosfoamide of klasse I-antigenen werden eveneens geanalyseerd met de CD45- en CD14-reeks (Tabel 18). De lijn van CD45-laag, CD45-hoog en CD4-medium is arbitrair. Behandeling van bloedmonster 5/6 (bij 2 uur) met monoklonale antilichamen tegen de β -keten van het DR-antigen of met dit monoklonaal antilichaam plus cyclofosfoamide leverde CD45⁺-laag-cellen en deed het relatieve aantal CD45⁺-medium-cellen verhogen. Echter deed de eerstgenoemde behandeling het relatieve aantal CD45⁺-hoog-cellen toenemen en laatstgenoemde behandeling deed het relatieve aantal CD45⁺-medium-cellen afnemen en deze wijzigingen bleken tijdsafhankelijk te zijn.
35

Bloedmonsters van patiënt 5/6 en 10 (B-CLL) bij behandeling met monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigenen vertoonde een afname van het relatieve aantal CD45⁺-medium-cellen en vergelijkbare waarnemingen werden gedaan bij bloedmonsters 09 en HIV⁺ na dezelfde behan-

deling in vergelijking met onbehandelde monsters. Behandeling van bloedmonsters van HIV⁺- en IgA/D-patiënten met monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigen deed het relatieve aantal van CD45⁺-laag-cellen toenemen in vergelijking met onbehandelde monsters of
5 monsters, behandeld met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het DR-antigen. Bloedmonsters van deze patiënten vertoonden echter een afname van het relatieve aantal CD45⁺-medium-cellen bij de behandeling met monoklonaal antilichaam tegen de homologe gebieden van de β -keten van het DR-antigen. Het aantal medium-CD45⁺-cellen nam toe in
10 bloedmonsters van een IgA/D-patiënt na behandeling met monoklonaal antilichaam tegen klasse I-antigen. Cellen die buitengewoon groot en in hoge mate granulair waren en grote hoeveelheden CD45-antigen tot expressie brachten werden waargenomen in bloedmonsters die behandeld waren met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de B-
15 keten van DR-antigen van MHC-klasse II-antigenen (zie Kaarten 1, 2, 3 & 4).

CD8- EN CD28-REEKS

Het CD28-antigen is aanwezig op ongeveer 60-80% van perifeer
20 bloed-T(CD3⁺)lymfocyten, 50% van CD8⁺-lymfocyten en 5% van onrijpe CD3-thymocyten. Gedurende de rijping van thymocyten neemt de expressie van CD28-antigen toe van lage dichtheid op de meeste CD4⁺CD8⁺-onrijpe thymocyten tot een hogere dichtheid op nagenoeg alle rijpe CD3⁺-, CD4⁺- of CD8⁺-thymocyten. Celactivering verhoogt de CD28-antigendichtheid verder. Expressie van het CD28 verdeelt de CD8⁺-lymfocyten in twee functionele groepen. CD8⁺CD28⁺-lymfocyten bemiddelen in de alloantigen-specifieke cytotoxiciteit, dat major histocompatibility complex (MHC) klasse I-beperkt is. Onderdrukking van celpoliferatie wordt bemiddeld door de subreeks CD8⁺CD28⁻. Het CD28-antigen is
25 gendichtheid verder. Expressie van het CD28 verdeelt de CD8⁺-lymfocyten in twee functionele groepen. CD8⁺CD28⁺-lymfocyten bemiddelen in de alloantigen-specifieke cytotoxiciteit, dat major histocompatibility complex (MHC) klasse I-beperkt is. Onderdrukking van celpoliferatie wordt bemiddeld door de subreeks CD8⁺CD28⁻. Het CD28-antigen is
30 een celadhesiemolecuul en werkt als een ligand voor het B7/BB-1-antigen dat aanwezig is op geactiveerde B-lymfocyten.

Behandeling van bloedmonsters in een inrichting volgens de uitvinding van patiënten (Tabel 19, patiënten 5/6 en 8) met B-CLL met monoklonaal antilichaam antilichaam tegen het homologe gebied van de
35 β -keten van het DR-antigen deed het relatieve aantal van CD8⁺-, CD28⁺- en CD8⁺CD28⁺-cellen toenemen, hetgeen niet gebeurde bij alle andere behandelingstypen.

CD34- EN CD2-REEKS

Het CD34-antigen is aanwezig op onrijpe hematopoietische voorlopercellen en op alle hematopoietische kolonievormende cellen in beenmerg, waaronder omniponente (CFU-GM, BFU-E) en pluripotente voorlopers (CFU-GEMM, CFU-Mix en CFU-blast). Het CD34 wordt eveneens in stromale celvoorlopers tot expressie gebracht. Terminale deoxynucleotidyltransferase (TdT)⁺-B- en T-lymfoïde voorlopers in normaal bot zijn CD34⁺. Het CD34-antigen is aanwezig op vroege myeloïde cellen die CD33-antigen tot expressie brengen, maar de CD14- en CD25-antigenen missen, alsmede op vroege erythroïde cellen die CD71-antigen tot expressie brengen en het CD45-antigen zwakt tot expressie brengen. Het CD34-antigen wordt eveneens aangetroffen op capillaire endotheelcellen en op ongeveer 1% van de menselijke thymocyten. Normale perifeer-bloedlymfocyten, monocyten, granulocyten en plaatjes brengen het CD34-antigen niet tot expressie. De CD34-antigendichtheid is het hoogst op vroege hematopoietische voorlopercellen en neemt af zodra de cellen rijpen. Het antigen is afwezig op volledig gedifferentieerde hematopoietische cellen.

Niet-toegewijde CD34⁺-voorlopercellen zijn CD38⁻, DR⁻ en missen lijn-specifieke antigenen, zoals CD71, CD33, CD10 en CD5, terwijl CD34⁺-cellen, die zich aan lijn hebben toegewijd, het CD38-antigen in hoge dichtheid tot expressie brengen.

De meeste CD34⁺-cellen brengen op reciproke wijze ofwel de CD45RO- of de CD45 RA-antigenen tot expressie. Ongeveer 60% van de acute B-lymfoïde-leukemieën en acute myeloïde-leukemieën brengen CD34-antigen tot expressie. Het antigen wordt niet tot expressie gebracht op chronische lymfoïde-leukemieën (B- of T-lijn) of op lymfoma's. Het CD2-antigen is aanwezig op T-lymfocyten en op een subreeks van natuurlijke killer-lymfocyten (NK).

De resultaten zijn getoond in Kaarten 2, 3 en 4.

Analyse van bloedmonsters van een patiënt met B-CLL (Tabel 20, patiënt 5/6 bij 2 uur) na behandeling met monoklonale antilichamen tegen de β -keten van DR-antigen of tegen de α -keten van hetzelfde antigen bracht aanmerkelijke toename aan het licht wat betreft het relatief aantal CD34⁺- en CD34⁺CD2⁺-cellen na behandeling met het eerstgenoemde antilichaam. Omdat dezelfde bloedmonsters waren immunofenotypeerd met bovengenoemde reeksen (zie Tabellen 14-19) voor andere merkers, blijkt de hier waargenomen toename van het relatieve aantal CD34⁺- en CD34⁺CD2⁺-cellen samen te gaan met toename van het

relatieve aantal $CD4^+CD8^-$, $CD8^+CD3^-$ en $CD4^+CD3^-$ -enkel-positieve(SP)cellen. Voorts ondersteunen deze vindingen, die exclusief lijken te zijn voor de rol van de β -keten van het HLA-DR-antigen, op directe wijze dat het proces leidt tot T-lymfopoïese via B-lymfocytre-
5 gressie.

Bij het analyseren van dezelfde behandeling 24 uur later, leken de $CD34^+$ -cellen in aantal toe te nemen, hetgeen leidt tot een verdere toename van het relatieve aantal T-lymfocyten. Het proces van teruggedifferentiatie dat aanvankelijk T-lymfopoïese tot gevolg had kan worden omgedraaid, waarbij B-lymfopoïese wordt verkregen. Het eerstge-
10 noemde fenomeen werd waargenomen bij 2 uur incubatietijd met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van HLA-DR-antigen plus cyclofosfoamide, terwijl laatstgenoemd proces werd waargenomen bij een incubatietijd van 24 uur met dezelfde behandeling in hetzelfde monster
15 (Kaart 2).

Behandeling van bloedmonsters van een HIV^+ -patiënt (Tabel 20, patiënt HIV^+) met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het HLA-DR-antigen deed het relatieve aantal van $CD34^+$ - en $CD2^+CD34^+$ -cellen aanmerkelijk toenemen, hetgeen eveneens plaatsvond bij behandeling van hetzelfde bloedmonster met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het HLA-DR-antigen en monoklonaal antilichaam tegen de α -keten van hetzelfde antigen, wanneer deze gezamenlijk werden toegevoegd. Echter had behandeling van dit bloedmonsters met monoklonaal antilichaam tegen de α -keten van het HLA-DR-antigen geen invloed op
25 de hoeveelheid $CD34^+$ -cellen. Behandeling van bloedmonsters die waren verkregen van een 6 dagen oude baby (BB/ST Tabel 20) die op dat moment werd onderzocht op leukemie en die een zeer hoog aantal atypische cellen (blasten) in zijn bloed had, met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het HLA-DR-antigen of met monoklonaal antilichaam tegen de α -keten van hetzelfde antigen, of beide monoklonale antilichamen gezamenlijk toegevoegd, leidde tot de volgende immuunfenotypische wijzigingen.

Bij analyse van onbehandelde bloedmonsters nam het relatieve aantal van $CD34^+$ - en DR^+ -cellen aanmerkelijk toe en bij behandeling
35 met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten nam het relatieve aantal $CD34^+$ -cellen verder toe maar men nam waar dat dit afnam bij behandeling met monoklonaal antilichaam tegen de α -keten van het HLA-DR-antigen of bij behandeling met monoklonale antilichamen tegen de α - en β -ketens van het molecuul, wanneer deze gezamenlijk werden toege-

voegd. Bij laatstgenoemde behandeling nam het relatieve aantal van CD34⁺CD2⁺-cellen echter toe en het tegenovergestelde gebeurde wanneer hetzelfde bloedmonster werd behandeld met alleen het monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het HLA-DR-antigen. Bij analyse van
5 behandelde en onbehandelde bloedmonsters van dezelfde patiënt 24 uur later, was het relatieve aantal CD34⁺- bij alle bovengenoemde behandelingen afgenomen, behalve bij behandeling met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van het HLA-DR-antigen, waarbij het in een veel grotere hoeveelheid werd gehandhaafd. Bij laatstgenoemde behan-
10 deling bleef de relatieve hoeveelheid CD34⁺CD2⁺-cellen 24 uur later dalen.

Deze resultaten geven aan dat de rol van het HLA-DR-antigen via de β -keten de vorming van meer CD34⁺-cellen van de CD2⁺CD34⁺-verzameling of van rijpere typen cellen, zoals B-lymfocyten van patiënten
15 met B-CLL bevordert en dat deze resultaten aangeven dat dit behandelingstype teruggedifferentiatie bevordert. Echter suggereert immuunfenotypering van bloedmonsters, 24 uur later, dat deze celtypen alle in een andere lijn bestaan en dat cellen in dit geval blijven bestaan in plaats van zich toe te wijden tot de myeloïde lijn, hetgeen werd
20 waargenomen bij analyse van een behandeld bloedmonster met de CD7- en CD13&33-reeks.

Morfologie wijzigt de immuunfenotypische kenmerken van B-lymfocyten van B-CLL en van verrijkte fracties van gezonde individuen (met CD19-bolletjes) bij behandeling met monoklonale antilichamen tegen
25 homologe gebieden van de β -keten van MHC-klasse II-antigenen. Dit werd bereikt door een verandering in de morfologie van B-lymfocyten. Men nam waar dat B-lymfocyten die glasplaatjes in onbehandelde bloedsmeren koloniseerden, werden vervangen door granulocyten, monocyt
cyten, grote aantallen primitief-ogende cellen en genculeerde rode
30 bloedcellen. Er werden geen mitotische beelden of significante celdood waargenomen in behandelde of onbehandelde bloedsmeren.

De resultaten van Tabel 20 geven eveneens een volgende belangrijke vinding aan, namelijk dat volgens de werkwijze volgens de uitvinding het mogelijk is een ongedifferentieerde cel te bereiden door
35 teruggedifferentiatie van een meer rijpe ongedifferentieerde cel.

D. MICROSCOOP-BEELDEN

In aanvulling op het bovengenoemde testen op antigen werd de werkwijze volgens de uitvinding visueel gevolgd met een microscoop.

De inrichting volgens de uitvinding kan zodanig worden geprogrammeerd dat deze de wijzigingen automatisch met behulp van volgmiddelen volgt.

Met betrekking hiertoe is fig. 8 een microscopische afbeelding 5 van gedifferentieerde B-cellen voorafgaand aan de werkwijze van de uitvinding. Fig. 9 is een microscopische afbeelding van ongedifferentieerde cellen die zijn gevormd door de terugdifferentiatie van B-cellen volgens de uitvinding, waarin het middel een monoklonaal antilichaam was tegen de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR-antigenen. De ongedifferentieerde cellen zijn de donkergekleurde celklompen. Fig. 10 is een microscopische afbeelding van dezelfde ongedifferentieerde cellen, maar bij een lagere vergroting.

Fig. 8-10 tonen derhalve visueel de terugdifferentiatie van B-cellen naar ongedifferentieerde stamcellen door de werkwijze volgens 15 de werkwijze aan.

Fig. 11 is een microscopische afbeelding van gedifferentieerde B-cellen voorafgaand aan de werkwijze volgens de uitvinding. Fig. 12 is een microscopische afbeelding van ongedifferentieerde cellen, gevormd door de terugdifferentiatie van de B-cellen volgens de uitvinding, waarin het gebruikte middel een monoklonaal antilichaam was tegen de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR-antigenen. Wederom waren de ongedifferentieerde cellen de donkergekleurde celklompen. Fig. 13 is een microscopische afbeelding van de vorming van gedifferentieerde granulocytcellen van dezelfde ongedifferentieerde cellen 25 van fig. 12.

Fig. 11-13 tonen derhalve visueel de terugdifferentiatie van B-cellen naar ongedifferentieerde stamcellen door de werkwijze volgens de uitvinding aan, gevolgd door toewijding van de ongedifferentieerde cellen tot nieuwe gedifferentieerde cellen die van een andere lijn 30 zijn dan de oorspronkelijke gedifferentieerde cellen, aan.

Deze microscopie-experimenten zijn eveneens uitgevoerd met bloed van B-CLL-patiënten dat, zoals hierboven is beschreven, was behandeld met het CR3/43 monoklonale antilichaam. Zoals hierboven is besproken is bloed van B-CLL-cellen een bruikbaar hulpmiddel voor het 35 onderzoeken van het terugdifferentiatieproces omdat het bloed meer B-lymfocyten bevat dan normaal. De resultaten worden in detail in fig. 14-17 getoond.

Fig. 14 toont bij twee verschillende vergrotingen een onbehandeld bloedmonster van een B-CLL-patiënt. De onbehandelde B-lymfocyten

(blauwe cellen) tonen een typische morfologie, d.w.z. een gecondenseerde chromatinestructuur en een klein cytoplasma. De resterende cellen zijn erythrocyten (rode bloedcellen).

Behandeling van bloedcellen met antilichaam CR3/43 leidt aan-
5 vankelijk tot samenvoeging van B-lymfocyten tot aggregaten (fig. 15).

De samengevoegde B-cellen verliezen geleidelijk hun typische morfologie, gekenmerkt door de vorming van kei-achtige celgebieden, decondensatie van de chromatinestructuur, verschijnen van duidelijke nucleoli, vergroting van het celvolume en cytoplasmatische basofilie,
10 die typisch is voor ongedifferentieerde cellen (fig. 16). Een ontspannen (gedecondenseerde) chromatinestructuur is een belangrijk kenmerk van ongedifferentieerde cellen in vergelijking met gedifferentieerde cellen. Dit is waarschijnlijk het gevolg van een behoefte aan een meer uitgebreidere toegang tot transcriptionele eenheden voor het
15 bepalen van wijzigingen in genexpressie die nodig is voor toewijzing langs een gegeven cellijn. Daarentegen is het algemeen bekend dat een meer gedifferentieerde cel een meer gecondenseerde chromatinestructuur bezit, omdat slechts een kleine hoeveelheid chromatine transcriptieel werkzaam hoeft te zijn.

20 Het verschijnen van ongedifferentieerde cellen gaat altijd gepaard door het verschijnen van cellen (17A-17J) met een gedifferentieerde morfologie. Het is belangrijk op te merken dat deze cellen niet kunnen zijn ontstaan door proliferatie omdat (i) de incubatietijd te kort was voor het plaatsvinden van een of meer volledige celdelingen, (ii) geen mitotische beelden werden waargenomen en (iii)
25 het absolute aantal leukocyten hetzelfde bleef gedurende en na de behandeling. Voorts werden minder gedifferentieerde voorlopers waargenomen in samenhang met de meer gedifferentieerde nakomelingen ervan (zie de myeloïde voorloper in fig. 17J), hetgeen aangeeft dat deze
30 gespecialiseerde cellen voortvloeien uit differentiatie.

Microscopische afbeeldingen fig. 17A-17J tonen het type ongedifferentieerde cellen die worden waargenomen na behandeling van B-CLL-lymfocyten met CR3/43 monoklonale antilichamen: plaatjes (PI) - fig. 17A, neutrofielen (Ne) - fig. 17B, eosinofielen (Eso) - fig.
35 17C, megakaryocyten (Meg) - fig. 17D, basofielen (Ba) - fig. 17G, lymfocyten (Ly) - fig. 17H, monocyten (Mo) - fig. 17I en myeloïde voorlopers (Mp) - fig. 17J. Eveneens werden erythroïde voorlopers en macrofagen waargenomen (gegevens niet getoond).

Aldus tonen deze microscopie-resultaten samengevat wijzigingen in B-cel-morfologie in monsters van B-CLL-patiënten die grote hoeveelheden rijpe B-lymfocyten bevatten. De microscopische afbeeldingen tonen wijzigingen in de morfologie van B-lymfocyten, die aanvankelijk
5 samenklonteren, gevolgd door het verschijnen van diverse cellen met een geleidelijke morfologieverschuiving van voorlopercellen naar gedifferentieerde cellen (neutrofielen, basofielen, eosinofielen, megakaryocyten, plaatjes, lymfocyten, macrofagen, granulocyten, steek(eng. stab)-granulocyten en stroma-achtige cellen).

10 Bovendien wordt als zeer belangrijk aspect de aanwezigheid van erythroïde en myeloïde voorlopers waargenomen (fig. 17J - en niet-weergegeven gegevens). De myeloïdevoorloper is morfologisch duidelijk te onderscheiden van andere cellen, waarbij deze groter zijn met een aparte nucleaire morfologie, en bevatten tevens cytoplasmatische gra-
15 nula.

De microscopische gegevens ondersteunen morfologisch derhalve datgene wat de stroomcytometriegegevens inzake celoppervlakmarkers aangeven. Door deze gegevens kan men concluderen dat behandeling van B-lymfocyten met een antilichaam tegen de MHC-HLA-DR- β -keten leidt
20 tot een afname van het aantal B-lymfocyten en tot een toename in het aantal cellen van andere hematopoietische lijnen, waaronder onrijpe voorlopercellen.

De teruggedifferentiatie van T-cellen, behandeld met een antilichaam tegen een MHC-klasse II- α -keten (monoklonaal antilichaam
25 TAL.1B5) tot ongedifferentieerde stamcellen met de werkwijze volgens de uitvinding, gevolgd door toewijding van de ongedifferentieerde cellen tot nieuwe gedifferentieerde cellen van een andere cellijn dan de oorspronkelijke gedifferentieerde cellen werd eveneens met microscopie nagegaan (gegevens niet getoond).

30

E. ANALYSE VAN VDJ-RECOMBINATIE-HERRANGSCHIKKINGEN IN TERUGGEDIFFERENTIEERDE LYMFOCYTEN

Als achtergrondinformatie bezitten de gedifferentieerde cellen die in deze experimenten worden gebruikt (B-lymfocyten of cellen met
35 bepaalde eigenschappen van T-lymfocyten), genen die reeds herrangschikking hebben ondergaan, waarbij deze respectievelijk coderen voor een rijp Ig of een TCR. In het herrangschikkingsproces worden tussen-gelegen gedeelten van DNA dat geen deel uitmaakt van het uiteinde-lijke tot expressie gebrachte TCR- of Ig-gen, voornamelijk DNA dat

gelegen is tussen het segment dat codeert voor het variabele (V) gebied en het segment dat codeert voor het constante (C) gebied van deze receptoren, worden uit het genoom gekliefd. Deze uitgesneden fragmenten worden in de cel in de vorm van extra chromosomaal DNA gehandhaafd. Voor het werkelijk teruggedifferentiëren van cellen zou het uitgesneden DNA moeten worden teruggezet in het genoom, waarbij de cellen in een toestand worden gezet die vergelijkbaar is met die welke voorafging aan hun oorspronkelijke differentiatie. Derhalve verwacht men dat een probe die complementair is aan een sequentie in het geherrangschikte gen zal hybridiseren met een groter DNA-restrictiefragment wanneer het DNA is teruggekeerd in de on-geherrangschikte of kiembaan-toestand in vergelijking met het geherrangschikt DNA dat de gedifferentieerde toestand kenmerkt.

1. Herrangschikking van TCR-genen in Daudi-cellen

In het experiment dat leidde tot de Southern-blot die in fig. 18 is getoond werd een algemeen bekende cellijn, Daudi, een B-cel-lymfoom met een hergerangschikt TCR-gen (waarbij het andere gen is verwijderd) gebruikt. Genomisch DNA werd uit de Daudi-cellen bereid en met EcoRI gedigereerd, onderworpen aan gelelektroforese en onderworpen aan een gemerkte TCR- β -keten-DNA als probe. Daudi-cellen werden in plaats van uit menselijke patiënten gezuiverde B-lymfocyten gebruikt, omdat deze cellen klonaal verwant zijn en een homogene celpopulatie vormen met dezelfde geherrangschikkingen die duidelijk kunnen worden getoond door Southern-blotting of met gedigereerd genomisch DNA. In een normaal bloedmonster hebben verschillende cellen verschillende herrangschikkingen waardoor een Southern-blot er als een smeer zou uitzien.

Een functioneel gen dat codeert voor de TCR- β -keten wordt in lymfocyten samengesteld door een reeks somatische herrangschikkingen die plaatsvinden gedurende de lymfocytrijping waarbij een V-segment, een D-segment en een J-segment bij elkaar worden gebracht. Een zeer duidelijke uitleg van deze herrangschikkingsprocessen wordt gegeven in Genes VI, Lewin, Oxford University Press, 1997 (blz. 1994-1023) - een standaardnaslagwerk voor studenten. Van belang zijnde bladzijden worden hieronder aangegeven.

Ten eerste wordt een D-segment door een recombinatieproces gekoppeld aan een of diverse J-segmenten in een D-J-koppelingsreactie. Vervolgens wordt een van de vele mogelijke V-segmenten (<60) gekop-

peld aan het hieruit voortvloeiende DJ-segment (V-D-koppeling) waarbij een volledig TCR- β -keten wordt gevormd. Het gen voor het constante gebied ligt onmiddellijk stroomafwaarts van het geherrangschikt VDJ-segment, ofschoon er tussenliggende J-segmenten aanwezig
5 kunnen zijn die worden weggekliefd gedurende de RNA-bewerking, waarbij het exon van het constante gen in de nabijheid van het geherrangschikt VDJ-gensegment wordt gebracht (Lewin, blz. 998).

In menselijke cellen zijn er twee verschillende gensegmenten voor het TCR- β -keten-constante gebied, C β 1 en C β 2 genoemd, aanwezig
10 op twee verschillende loci, die elk worden voorafgegaan door een cluster van zes of zeven gensegmenten voor het koppelingsgebied (J β) (J β 1 en J β 2), en één D-segment (D β 1 en D β 2) (zie fig. 1, Toyonaga et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8624-8628 en Lewin, blz. 1017).

15 De recombinatiegebeurtenissen die leiden tot het bij elkaar brengen van de V-, D- en J-C-segmenten worden gekatalyseerd door meerdere eiwitten, waaronder RAG-1 en RAG-2, die nonameer- en heptameersequenties herkennen die aanwezig zijn bij de recombinerende uiteinden van de V-, D- en J-C-gensequenties. Afhankelijk van de oriëntatie van deze nonameer/heptameer-sequenties resulteert recombinatie
20 ofwel in een omkering ofwel in een deletie. Beide gebeurtenistypen zullen leiden tot een verandering van het restrictie-enzym patroon van het genomisch DNA. Voorts leidt een deletiegebeurtenis niet noodzakelijkerwijs tot een volledig verlies van het uitgekliefde fragment. De uiteinden van het uitgekliefde fragment worden daarentegen aan elkaar
25 gekoppeld waarbij een cirkelvormig DNA wordt gevormd dat in de cel blijft (Okazi et al., 1987, Cell 49: 477-85; Davis et al., 1991, J. Exp. Med. 173: 743-6; Livak en Schatz, 1996, Mol. Cell Biol. 16: 609-19; Harriman et al. 1993, Annu. Rev. Immunol. 11: 361-84). Elk
30 gensegment heeft uiteraard twee allelen, omdat cellen een diploïd chromosoomcomplement bevatten.

In de normale kiembaantoestand zijn de C β 1- en C β 2-genen gerangschikt zoals in fig. 1, Toyonaga et al. 1985 is getoond. Een restrictiedigest van genomisch DNA met *EcoRI* zal twee relevante banden
35 vormen die aantoonbaar zijn met de probe die in het experiment wordt gebruikt (de probe is een gemerkt DNA-fragment, afgeleid van C β 1, die eveneens hybridiseert met C β 2 als gevolg van een hoge mate van sequentiehomologie) : (i) een band van 12 kb die de C β 1-sequentie bevat; en (ii) een band van 4 kb die de C β 2-sequentie bevat. Deze kiem

baanconfiguratie wordt waargenomen in ongedifferentieerde onrijpe cellen (laan A van fig. 18). Deze kiembaanconfiguratie wordt eveneens perfect weergegeven door laan 3 (2 uur met CR3/43-antilichaam) van fig. 18, hetgeen een identiek patroon oplevert als dat van laan A.

5 In de gedifferentieerde toestand worden beide allelen van de C β 1- en C β 2-genen zodanig geherrangschikt dat er niet langer een fragment van 12 kb aanwezig is bij de C β 1-locus of een fragment van 4 kb bij de C β 2-locus. In feite is er geen hybridiserend fragment, afgeleid van de C β 1-locus aanwezig op de gel (dit is het gevolg van
10 deletie van de hybridiserende sequentie uit beide C β 1-allelen als gevolg van recombinatie). Met betrekking tot de C β 2-locus zijn er nu feitelijk twee overheersende banden die overeenkomen met verschillende "allelen", die voortvloeien uit herrangschikkingen op beide chromosomen. De grootste band, die kleiner is dan 4 kb, komt overeen met
15 een fragment van een van de twee geherrangschikte allelen. De laagste band is een fragment van het andere geherrangschikte allel. De tussengelegen minder overheersende band is waarschijnlijk afkomstig van een subkloon van Daudi-cellen met een andere herrangschikking - vandaar de aanwezigheid ervan in een submolaire hoeveelheid ten opzichte
20 van elk van beide allelen. Desalniettemin is de geherrangschikte toestand zeer duidelijk getoond in laan 1, waarin beide overheersende banden duidelijk zichtbaar zijn.

2 Uur met het negatieve controleantilichaam (TAL.1B5) dat met de α -keten van MHC-DR bindt, leidt feitelijk tot het verlies van de
25 bovenste band, terwijl de laagste band een vergelijkbare intensiteit heeft als die van de onbehandelde cellen in laan 1 (zie laan 2). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de cellen aan het differentiëren zijn, hetgeen verder leidt tot een verdere recombinatiegebeurtenis bij het C β 2-locus van één allel, hetgeen leidt tot verlies van C β 2-
30 sequenties. Dit is volledig consistent met bekende fenomenen.

24 Uur met het negatieve controleantilichaam blijkt de drie banden die in de onbehandelde cellen worden waargenomen te herstellen (zie laan 4). Deze banden migreren feitelijk echter bij een lagere positie dan de banden die in laan 2 worden waargenomen. Het is niet
35 geheel duidelijk hoe dit kan zijn ontstaan. Een mogelijke verklaring is dat herintegratie van gedeleteerde sequenties heeft plaatsgevonden, consistent met het uitlus-uitsnijd-reintegratiemodel (Malissen *et al.*, 1986, Nature 319: 28-32). Desalniettemin is geen resultaat dat wordt waargenomen met het TAL.1B5-antilichaam bij 2 uur of 24 uur

indicatief voor een herrangschikking naar het kiembaanpatroon. Lanen 2 en 4 vertegenwoordigen feitelijk een negatieve controle - het antilichaam tegen de α -keten leidt niet tot herstel van de kiembaanse-quenties.

5 Daarentegen vertonen de resultaten die zijn verkregen met een monoklonaal antilichaam (CR3/43) tegen de β -keten van MHC-DR na 2 uur een bandenpatroon dat overeenkomt met de kiembaanconfiguratie, namelijk een band van 12 kb en een band van 4 kb (vergelijk laan 3 met laan A). Met andere woorden tonen deze resultaten dat het kiembaanre-
10 strictiepatroon bij de C β 1- en C β 2-loci voor alle allelen is hersteld.

Uit deze resultaten concluderen wij dat een bandenpatroon dat wordt waargenomen in laan 3 indicatief is voor een herrangschikking van het genomisch DNA van de gedifferentieerde cellen, waarbij de
15 kiembaanconfiguratie wordt geregenereerd.

Het belang van deze vinding dient niet te worden onderschat. Een genomische herrangschikking, inclusief deleties, kan worden omgekeerd om het genoom te herstellen tot de toestand waarin het bestond voordat het differentiatieproces plaatsvond. De meest waarschijnlijke
20 verklaring ligt in het feit dat de inversie, veroorzaakt door de herrangschikking van de C β 2-allelen gedurende differentiatie is omgekeerd en dat de deletie van de C β 1-sequentie, die een verlies van de banden van 12 kb veroorzaakte, eveneens is omgekeerd. De bron voor de missende C β 1-sequentie is waarschijnlijk episomaal circulair DNA van
25 de oorspronkelijke deletiegebeurtenis, dat in de kern aanwezig is. De aanwezigheid van dit circulair DNA is in de stand van de techniek beschreven (zie bovengenoemde verwijzingen). Desalniettemin is het precieze mechanisme waarmee het herstel van het kiembaangenoom heeft plaatsgevonden niet belangrijk. Wat wel belangrijk is, is het feit
30 dat de gebeurtenis heeft plaatsgevonden.

Een voortgezette incubatie met het monoklonaal antilichaam (CR3/43) tegen de β -keten van MHC-DR gedurende 24 uur in de inrichting volgens de uitvinding leidt tot een meer complex bandenpatroon (laan 5). Deze banden vertegenwoordigen echter niet dezelfde banden
35 als in de onbehandelde controle. In het bijzonder zijn de fragmenten van ongeveer 12 kb die met de probe hybridiseren nog steeds aanwezig ("C β 2-allelen"). Voorts is het belangrijk te beseffen dat de banden die "C β 2-allelen" zijn genoemd niet overeenkomen met de band die kleiner is dan 4 kb die wordt waargenomen in de onbehandelde controle

(laan 1). De meest waarschijnlijke verklaring voor de resultaten die in lijn 5 worden waargenomen is dat een secundaire herrangschikking-gebeurtenis heeft plaatsgevonden, omdat het hybridisatiepatroon lijkt op dat van T-cellen omdat het wordt gekenmerkt door een geherrang-
5 schikt TCR-gen (deze verklaring is consistent met de stroom-cytometriegegevens die een toename van cellen met celmerkers die kenmerkend zijn voor T-cellen tonen). Desalniettemin zijn, onafhankelijk van de precieze moleculaire verklaring, de resultaten die in laan 5 bij 24 uur blootstelling aan het CR3/43-antilichaam worden waargenomen on-
10 dersteunend voor de resultaten die zijn verkregen bij 2 uur blootstelling in laan 3.

2. Herrangschikking van een Ig-gen in B-CLL-cellen

Het Southern-blot dat in fig. 19 wordt getoond werd verkregen
15 met perifere bloedcellen uit patiënten met chronische lymfocytische leukemie (B-CLL). Genomisch DNA werd uit deze in hoofdzaak monoklonale B-cellen bereid en gedigereerd met *Bam*HI en *Hind*III en onderworpen aan gelelektroforese en aan een gemerkt TCR-DNA als probe. Deze B-CLL-cellen werden gedurende 24 uur behandeld met het CR3/43 (anti-
20 klasse II-MHC-keten van HLA-DR, DP en DQ) hetgeen hierboven is beschreven. De blots werden onderworpen aan een radioactief gemarkeerde probe van het Ig J-gebied. De twee banden die werden verkregen uit de onbehandelde cellen in laan A vertegenwoordigen twee gerangschikte Ig-allelen (paternaal en maternaal). Deze banden verschenen niet in
25 laan B, die een patroon toont, 24 uur na antilichaambehandeling van de cellen. In plaats daarvan verscheen een band van 5,4 kb die kenmerkend is voor het kiembaan-Ig-gen.

In een ander experiment, in fig. 19A getoond, bleven de cellen onbehandeld of werden deze gedurende de aangegeven tijden behandeld
30 met het antiklasse II-MHC- β -keten-antilichaam. Het Ig-VDJ-gebied werd door middel van PCR geamplificeerd in de gedifferentieerde (controle) en in de met antilichaam behandelde B-CLL-cellen (linkerhelft van de gel). Dit vormde een VDJ-amplificatieproduct uit de onbehandelde cellen. Een dergelijke band werd echter niet waargenomen in de met anti-
35 lichaam behandelde cellen omdat, door de insertie van het uitgekliefd genomisch DNA, deze "kiembaan"-DNA-configuratie niet gevoelig was voor PCR-amplificatie met de gekozen VDJ-primers. Een vergelijkbaar experiment (rechterkant van de gel) maakte de visualisering van het gedrag van een controle, huishoudgen dat voor β -actine codeerde, mo-

gelijk. Er was geen verschil in het β -actine-PCR-amplificatieproduct, onafhankelijk van de behandeling. Aldus bleek dit "controle"gen niet te worden beïnvloed door het terugdifferentiatieproces dat enorme wijzigingen in het Ig-gen van dezelfde cellen onder dezelfde omstandigheden veroorzaakte.

De hierboven weergegeven resultaten tonen dat de behandeling van cellen met een middel dat aangrijpt op de juiste celoppervlakreceptor terugdifferentiatie van deze cellen induceert, hetgeen op moleculair niveau is aangetoond (en nagegaan) door het waarnemen van retrogressie van de herrangschikkingen van chromosomaal DNA die de gedifferentieerde toestand kenmerken. Aldus kan men op basis van het moleculair genetische en het morfologische bewijs concluderen dat cellen van de B-lymfocytlijn, behandeld met een middel (mAb) dat aangrijpt op de klasse II-MHC- β -keten, terugdifferentiatie ondergaan. Daarentegen worden dezelfde cellen, behandeld met antilichamen die samenwerken met klasse II- α -keten niet op vergelijkbare wijze tot terugdifferentiatie geïnduceerd. Het enige dat hierbij plaatsvindt, als het plaatsvindt, blijkt een (naar voren toe gerichte) differentiatie langs de B-cel-keten te zijn.

20

F. VERDER ONDERZOEK AAN TERUGDIFFERENTIATIE VAN B-LYMFOCYTEN

FACsVantage-gezuiverde BCLL-cellen (95% zuivere B-cellen) van BCLL-patiënten werden behandeld met het CR3/43-antilichaam in een inrichting volgens de uitvinding, zoals hierboven is beschreven en de cellen werden bewerkt door stroomcytometrie. De hieronder in Tabel A getoonde resultaten bevestigen de hierboven verkregen resultaten. Een significante toename van het aantal CD34⁺-cellen werd verkregen, samen met een grote afname van het aantal cellen die celoppervlakmarkers bezitten die kenmerkend zijn voor de B-lymfocytlijn (CD19, CD20 en CD22). Een belangrijk op te merken punt uit Tabel A is het feit dat eveneens een toename van het aantal cellen wordt getoond die zowel CD34-negatief als mede lijn-negatief zijn. Deze ongedifferentieerde cellen zijn niet toegewijd tot de hematopoietische lijn en gaan in differentiatie vooraf aan CD34⁺-stamcellen. Voorts toonde onderzoek van monsters met behulp van lichtmicroscopie een reeks adherente celtypen met morfologische kenmerken van niet-hematopoietische cellen.

Tabel A

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

Het verlies van CD19-celoppervlakmerkers, gepaard gaande met het verschijnen van CD34-celoppervlakmerkers op dezelfde cel is eveneens aangetoond en op video opgenomen in real-time-modus, waarbij gebruik werd gemaakt van convocale microscopie. B-lymfocyten kleurden voorafgaand aan het toevoegen van CD3/43 mab groen met een FITC-geconjugeerd monoklonaal antilichaam tegen CD19. Na het toevoegen van CR3/43 mab verloren de cellen hun groene fluorescentie en begonnen rood te kleuren met een PE/Cy5 (of kwantumrood) geconjugeerd monoklonaal antilichaam tegen CD34, maar kleurden niet groen (zie fig. 23, dat twee stilstaande beelden van het tijdsverloop van de video toont). De resultaten bevestigen duidelijk dat gedurende B-lymfocyterugdifferentiatie lijnspecifieke merkers, zoals CD19, verloren gaan, terwijl een stamcelmerker, zoals CD34, opnieuw tot expressie wordt gebracht.

G. ANDERE MIDDELEN DIE TERUGDIFFERENTIATIE VAN B-LYMFOCYTEN TOT HEMATOPOIETISCHE STAMCELLEN INDUCEREN

Aanvankelijke onderzoeken hebben feitelijk drie middelen geïdentificeerd - granulocyt/monocyt-koloniestimulerende factor (GM-CSF), erythropoietine en mAb CR3/43. Een preparaat van verrijkte, gezuiverde, normale B-lymfocyten werd behandeld in een inrichting volgens de uitvinding met een van deze drie middelen op vergelijkbare wijze zoals hierboven is beschreven voor CR3/43 en TAL.1B5 en de behandelde monsters werden zoals hierboven is beschreven door stroomcytometrie. In vergelijking met de negatieve controle vertoonden alle drie monsters die waren behandeld met ofwel GM-CSF, erythropoietine of mAb CR3/43 wijzigingen die consistent waren met terugdifferentia-

tie. In het bijzonder deden alle drie de middelen het relatieve aantal CD34⁺-cellen in de celpopulatie toenemen (zie fig. 20). Het grootste effect werd echter waargenomen met CR3/43 en bijgevolg werd dit middel gekozen voor gebruik in de meer gedetailleerde onderzoeken die hierin zijn beschreven.

H. EIGENSCHAPPEN VAN HEMATOPOIETISCHE STAMCELLEN, GEVORMD DOOR HET TERUGDIFFERENTIATIEPROCES

Kolonievormingstests

Om te bevestigen dat de CD34⁺-cellen, waargenomen door stroomcytometrie en dat de ongedifferentieerde cellen, geïdentificeerd door microscopie de eigenschappen van ongedifferentieerde hematopoietische cellen hadden, werden bloedmonsters die waren behandeld met een anti-lichaam tegen de klasse II-MHC- β -keten (CR3/43 - zie hierboven) on-
derworpen aan kolonievormende tests - een standaardwerkwijze die in het vakgebied bekend is voor het bepalen van de vermogens van primitieve hematopoietische cellen. De kolonievormende tests kunnen automatisch in de inrichting volgens de uitvinding als onderdeel van het volgmechanisme worden uitgevoerd.

In vitro-kloneringsstests voor hematopoietische stamcellen maken de kwantificatie van primitieve voorlopercellen die de mogelijkheid tot proliferatie, differentiatie en ontwikkeling tot fenotypische en functioneel rijpe myeloïde en/of erythroïde cellen hebben, mogelijk. Bijvoorbeeld zijn stamcellen in de aanwezigheid van groeifactoren, wanneer deze worden uitgezaaid/geïmmobiliseerd op een zachte-gelmatrix *in vitro* in staat tot klonale groei (proliferatie) en differentiatie.

Fig. 21 is een kolonietest van stamcellen, gevormd volgens de werkwijzen van de uitvinding, waarbij omgekeerd-helder-veld-microscopie werd toegepast. In deze test werden B-cellen, verkregen van de buffy-coat van gezonde bloeddonoren behandeld met CR3/43 mab en vervolgens onderworpen aan kolonietests zoals is beschreven in het onderdeel materiaal en methoden.

Reeksen (a)-(e) in fig. 21 tonen:

- a) helder-veld-microscopie van een kweekschal bij een vergroting van 3x, waarbij erythroïde, myeloïde en gemengde (bestaande uit rijpe myeloïde en erythroïde cellen) kolonieën worden getoond, die zelfs met het blote oog op eenvoudige wijze kunnen worden

waargenomen. Elke kolonie ontstond uit een enkele hematopoietische stamcel door polifерatie en daaropvolgende differentiatie.

- b) MIX-CFC; deze kolonie ontstond uit een enkele multipotente hematopoietische stamcel (stamcellen die zich kunnen ontwikkelen tot cellen van myeloïde en erythroïde lijnen).
- c) M-CFC; deze kolonie bestaat uit macrofagen.
- d) GM-CFC; deze kolonie bestaat uit de myeloïde lijn, inclusief macrofagen, granulocyten en megakaryocyten.
- e) BFU-E; deze kolonie bestaat uit cellen die behoren tot de erythroïde lijn, zoals normoblasten en niet-genucleëerde rode cellen. De rode kleuring van cellen toont dat deze een hoog gehalte hemoglobine bevatten. De grote afmeting van deze kolonie toont aan dat deze voortkwam uit een extreem primitieve stamcel.

15

Dezelfde resultaten werden verkregen met B-CLL-cellen (gegevens niet getoond). Onbehandelde B-cellen leverden geen hematopoietische kolonies (gegevens niet getoond). Deze resultaten tonen derhalve de aanwezigheid van levensvatbare hematopoietische stamcellen in bloedmonsters die zijn behandeld met het monoklonale antilichaam CR3/43 tegen de klasse II-MHC- β -keten, maar niet in onbehandelde bloedmonsters.

20

Lange-termijnkweek

25

Met de lange-termijntest wordt het zelfvernieuwingsvermogen van hematopoietische stamcellen onderzocht. In deze kweek worden de meeste stappen van beenmerghematopoiese *in vitro* gereproduceerd. Een belangrijk kenmerk van deze kweek is een aanhoudende hematopoiese, die plaatsvindt in de afwezigheid van toegevoegde groeifactoren. In deze test is het hematopoieseprocess absoluut afhankelijk van de vorming van een adherente laag van van beenmerg afkomstige stromacellen. Stromacellen (bestaande uit diverse niet-hematopoietische cellen, bijv. fibroblasten, vetcellen en omvattende alle celtypen die behoren tot het mesenchymale systeem) ondersteunen hematopoiese door het verschaffen van de juiste omgeving (uitscheiding van groeifactoren en de synthese van een extracellulaire matrix) om de overleving, zelfvernieuwing, proliferatie en differentiatie van de stamcellen te bevorderen.

30

35

In deze test leverde behandeling van B-cellen, verkregen uit buffy-coats van gezonde bloeddonoren (dezelfde resultaten werden verkregen met B-CLL-cellen) met CR3/43 mab binnen enkele uren na het toevoegen van het antilichaam de vorming van een adherente cellaag, die eveneens in de tijd toenam.

De adherente laag bestond uit stromacellen (dekencellen, die in hoofdzaak bestonden uit cellen van het fibroblast/mesenchymale type/lichtbrekende grote cellen wanneer deze met omgekeerd-helderveld-microscopie werden bekeken - zie fig. 22), die groei en de ontwikkeling van hematopoietische cellen tot 12 weken of langer ondersteunden (deze cellen hebben innig contact met hematopoietische cellen). In de adherente laag zijn eveneens groepen van primitieve hematopoietische cellen zichtbaar (eveneens bekend als keigebieden/clusters van donker-verschijnende cellen) die de oorsprong zijn van de verlengde vorming van hematopoietische cellen.

De niet-adherente lagen die bovenop de stromale laag liggen (clusters van helder-verschijnende cellen) bestaan uit kleine ronde cellen die clusters van hematopoietische foci vormen. Deze laag bestaat uit stamcellen en tevens uit meer toegewijde voorlopers van het hematopoietische systeem. De niet-adherente laag kon leiden tot MIX-CFC, GM-CFC, M-CFC, BFU-E (zoals bepaald met de klonale test) en tot CFU-F (kolonievormende eenheid-fibroblasten) (wanneer deze werden gesubkweekt met een lange-termijn kweekmedium).

25 I. RT-PCR VAN CELLEN, BEHANDELD MET EEN ANTILICHAAM TEGEN DE β -KETEN VAN HLA-DR

In Ramos (B-lymfoom) en K562 (erythroïde leukemie) -cellen, behandeld met het CR3/43 mab (monoklonaal antilichaam) werd de gen-transcriptie gemeten ten aanzien van CD34, c-kit (ligand van stamcel-factor), ϵ -hemaglobine (embryonale vorm van hemaglobine en β -actinegenen).

Werkwijzen

Voorafgaand en na behandeling met CR3/43 mab werd mRNA geëxtraheerd onder toepassing van RNazol (CINA BIOTECH). mRNA werd onderworpen aan hexameer-priming-reverse transcriptie door gedurende 5 min. bij kamertemperatuur te incuberen met 4 μ l standaardbuffer, 2 μ l dNTPs, 1 μ l RNasin, 1 μ l reverse primer (willekeurige hexameerprimer) en 1 μ l MMLV-reverse transcriptase-enzym. Dit mengsel werd verder ge-

5 durende 1 uur bij 38°C geïncubeerd. Mengsels werden vervolgens onder-
worpen aan PCR onder standaardomstandigheden met primers die waren
ontworpen om CD34, c-kit, ϵ -hemaglobine en β -actinesequenties te am-
pliceren. De primers werden volgens gepubliceerde gegevens gesynthe-
tiseerd bij het Randell Institute Kings College.

Resultaten

 De verkregen resultaten tonen dat de hoeveelheden CD34, c-kit
en ϵ -hemoglobine-mRNA alle significant toenamen na behandeling met
10 het CR3/43 mab, terwijl de hoeveelheden van β -actine-mRNA niet veran-
derden. De resultaten voor CD34 en c-kit vormen verder ondersteuning
van de gegevens die hierboven in detail zijn weergegeven, die aantou-
nen dat teruggedifferentiatie van B-lymfocyten leidt tot de vorming van
hematopoietische stamcellen.

15 De verkregen resultaten voor ϵ -hemoglobine zijn zelfs interes-
santer, omdat ϵ -hemoglobine normaal gesproken slechts in embryonale
cellen tot expressie wordt gebracht. Het is derhalve mogelijk dat be-
handeling met het CR3/43 mab niet alleen leidt tot hematopoietische
stamcellen, maar eveneens zelfs tot primitievere ongedifferentieerde
20 cellen, zoals embryonale stamcellen.

J. Samenvatting

 Samengevat kan de inrichting volgens de uitvinding worden ge-
bruikt voor de teruggedifferentiatie van gedifferentieerde cellen tot
25 stamcellen. De voorbeelden beschrijven *in vitro*-experimenten die ui-
termate interessante en vruchtbare vindingen aan het licht brengen
met betrekking tot de ontogenie en ontwikkeling van T- en B-lymfocy-
ten, die gebruikt kunnen worden voor de vorming van stamcellen om
lymfohematopoiese in monsters van perifeer bloed in slechts enkele
30 uren te beïnvloeden.

 Behandeling van monsters van perifeer bloed, verkregen uit pa-
tiënten met B-cel-chronische lymfocytische leukemieën (B-CLL) met
hoge hoeveelheden B-lymfocyten, met antilichaam tegen het homologe
gebied van de β -keten van klasse II-antigenen leidde tot een aanmer-
35 kelijke toename van het relatieve aantal enkel-positieve (SP) T-lym-
focyten en de voorlopers ervan, die dubbel-positief waren voor de
thymocytmerkers CD4- en CD8-antigenen en deze werden gelijktijdig ge-
coëxprimeerd. Deze fenomenen gingen echter altijd gepaard met een
significante toename van het relatieve aantal B-lymfocyten. Deze

— waarnemingen vond men niet wanneer dezelfde bloedmonsters werden behandeld met monoklonale antilichamen tegen het homologe gebied van de α -keten van de klasse II-antigenen of tegen het homologe gebied van klasse I-antigenen.

5 Behandeling van volledig bloed, verkregen van patiënten met B-cel-chronisch lymfocytische leukemie (CLL) in een inrichting volgens de uitvinding met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de B-keten van het HLA-DR-antigen bleek T-lymfopoïese tot gevolg te hebben. Deze gebeurtenis werd waargenomen door de verschijning van
10 dubbel-positieve cellen die de CD4- en CD8-merkers coëxprimeren, door de verschijning van cellen die CD34 tot expressie brengen en de daarmee gepaard gaande toename van het aantal enkel-positieve CD4⁺CD3⁺- en CD8⁺CD3⁺-lymfocyten. Voorts waren de immuunfenotypische wijzigingen die plaatsvonden bij de vorming van dergelijke cellen identiek
15 aan die, welke zijn beschreven voor thymocytontwikkeling, in het bijzonder wanneer deze in de tijd werden gemeten.

De percentages dubbel-positieve cellen (DP) die gevormd werden bij een 2 uren incubatietijd van volledig bloed met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het DR-antigen
20 namen in de tijd af en deze gebeurtenissen gingen gepaard met een toename van de percentages van enkel-positieve CD4⁺CD3⁺ en CD8⁺CD3⁺-cellen, zowel gelijktijdig als op latere tijdstippen. TCR α en β -ketens werden op deze celtypen eveneens tot expressie gebracht.

Men nam waar dat B-lymfocyten continu merkers zoals CD19, CD21,
25 CD23, IgM en DR verloren, hetgeen gepaard ging met het verschijnen van CD34⁺- en CD34⁺CD2⁺-cellen, een toename van CD7⁺-cellen, toenamen van CD8⁺CD28⁺- en CD28⁺-cellen, toenamen van CD25⁺-cellen, het verschijnen van CD10⁺- en CD34⁺-cellen en CD34⁺- en CD19⁺-cellen, toenamen van CD5⁺-cellen en cellen die lage hoeveelheden CD45-antigen tot
30 expressie brengen. Deze wijzigingen waren het gevolg van behandeling van bloed met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen.

De immuunfenotypische wijzigingen die gepaard gingen met een dergelijke behandeling zijn consistent met teruggedifferentiatie en
35 daaropvolgende toewijding (d.w.z. hernieuwde toewijding) van B-lymfocyten, omdat de meerderheid van witte bloedcellen in het bloed van patiënten met B-CLL voorafgaand aan de behandeling B-lymfocyten waren. Voorts waren B-lymfocyten van patiënten met B-CLL, die waren geïnduceerd om T-lymfocyten te worden na behandeling met cyclofosfo-

amide en monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van HLA-DR-antigen, in staat om terug te keren tot B-lymfocyten na een verlengde incubatie bij deze behandeling.

Analyse van behandelde monsters met monoklonaal antilichaam tegen de β -keten van HLA-DR-antigen, met CD16&5- en CD3- en CD8- en CD3-reeksen, bracht aan het licht dat het relatieve aantal cellen dat deze merkers tot expressie brengt, geleidelijk toeneemt in hoeveelheden die consistent zijn met die welke zijn bepaald met reeksen zoals CD19 en CD3 en DR en CD3. Onderzoek aan de bovenstaande vloeistof van behandelde en onbehandelde monsters van patiënten met HIV-infectie onder toepassing van neflometrie en immuunelektroforese bracht toegenomen hoeveelheden IgG aan het licht, hetgeen aangeeft dat de B-cellen het plasmacelstadium moeten hebben doorlopen. De toename van het relatieve aantal van alle hierboven genoemde cellen ging eveneens gepaard met het verschijnen van in hoge mate gegranuleerde cellen van middelmatige afmeting die CD56&16-antigenen in uitermate hoge hoeveelheden tot expressie brengen. Andere cellen die uitermate groot en in hoge mate gegranuleerd waren werden transiënt waargenomen en deze waren positief voor CD34 en dubbel-positief voor CD4CD8-merkers. Andere transiënte cellen werden eveneens waargenomen en deze waren groot en granulair en positief voor CD3- en CD19-receptoren. CD25, dat aanwezig was op het merendeel van de B-lymfocyten ging verloren en werd tot expressie gebracht door nieuw gevormde T-lymfocyten, waarvan altijd werd waargenomen dat deze in aantal toenamen.

CD28⁺CD8⁺- en CD28⁺-cellen verschenen na behandeling van volledig bloed van patiënten met B-CLL met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de B-keten van het DR-antigen. Deze resultaten waren het gevolg van behandeling van bloed met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van HLA-DR-antigen.

De op deze wijze gevormde T-lymfopoïese werd eveneens waargenomen in perifere bloed van gezonde bloeddonoren, navelstrengbloed, beenmerg, in patiënten met diverse infecties, waaronder HIV⁺-individen en AIDS-patiënten, in fracties die verrijkt waren in B-lymfocyten, verkregen van bloedmonsters van gezonde donoren, IgA-deficiënte patiënten en andere patiënten met diverse andere aandoeningen. Voorts toonde de analyse van myeloïde merkers in monsters van twee patiënten met B-CLL, behandeld met monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen een significante toename

van het relatieve aantal cellen dat de myeloïdemerkers zoals CD13 en CD33 tot expressie brachten.

Deze merkers werden gecoëxprimeerd met de CD56&16- of de CD7- antigenen. Echter werd het relatieve aantal CD7⁺-cellen met T-lymfo-
5 cytmerkers en zonder myeloïde-antigenen waargenomen bij een aparte celpopulatie. Deze waarnemingen kon men niet waarnemen in onbehandelde monsters of in monsters die waren behandeld met monoklonale antilichamen tegen klasse I-antigenen of tegen het homologe gebied van de α -keten van het HLA-DR-antigen (zie Kaarten 2 & 3). Deze uiteinde-
10 lijke resultaten suggereren dat deze lymfocyten die eenmaal via de β -keten van het HLA-DR-antigen zijn geprikkeld niet alleen in staat zijn terug te keren tot T-lymfocytyvoorlopercellen, maar eveneens in staat zijn te bestaan in de myeloïde en erythroïde lijnen.

Aldus tonen de in deze aanvraag weergegeven gegevens samengevat
15 aan dat in de inrichting volgens de uitvinding (i) het mogelijk is om gezonde cellen van een lijn van cellen om te zetten in cellen met de celoppervlakmerkers en morfologische kenmerken van cellen van diverse andere lijnen en (2) het mogelijk is cellen te verkrijgen met de celoppervlakmerkers en morfologische kenmerken van primitieve voorloper-
20 cellen (bijvoorbeeld stamcellen) uit gedifferentieerde B-lymfocyten en t-lymfocyten.

Opgemerkt dient te worden dat een aantal experimenten zijn uitgevoerd met BCLL-cellen. BCLL-cellen zijn rijpe B-lymfocyten die niet in staat zijn te differentiëren tot het uiteindelijke gedifferentieerde eindstadium van een plasmacel. Als gevolg van een chromosoomdefect vertonen zij daarentegen een hoge mate van proliferatie, vandaar het hoge aantal B-lymfocyten in het bloed van BCLL-patiënten. In tegenstelling tot een aantal tumorcellen die in de stand van de techniek zijn beschreven hebben B-CLL-cellen geen enkele vorm van beperkte reverse differentiatie voorafgaand aan de toepassing van de
30 werkwijzen volgens de uitvinding ondergaan. Voorts vertonen zij geen enkel kenmerk van ongedifferentieerde cellen wat betreft genomische structuur, celmerkers of celmorfologie. In alle opzichten zijn zij rijpe B-lymfocyten.

35 Terwijl sommige kwaadaardige cellen in beperkte mate enkele kenmerken van ongedifferentieerde cellen kunnen hebben is dit aldus niet het geval voor B-CLL-cellen, die een perfect aanvaardbaar experimenteel systeem vormen voor het onderzoeken van B-lymfocyten. Feitelijk zijn BCLL- en Daudi-cellen niet zodanig anders dan normale

cellen in enig opzicht dat relevant voor deze experimenten is. De geschiktheid van BCLL-cellen in een modelsysteem is inderdaad bevestigd door Martensson *et al.*, 1989, Eur. J. Immunol. 19:1625-1629 (zie blz. 1625 rhs, par. 1).

5 Bovendien resulteerde behandeling van menselijke buffy-coat-bloedmonsters van gezonden donoren met CR3/43-monoklonaal antilichaam tot een hoger voorkomen van CD34 (stamcelmarker) en een lager voorkomen van CD19 (B-lymfocytmarker).

 Opgemerkt dient te worden dat de stamcellen die worden gevormd
10 door de werkwijze volgens de uitvinding stamcellen van elk willekeurig weefsel kunnen zijn en niet noodzakelijkerwijs zijn beperkt tot lymfohematopoietische voorlopercellen.

 Andere modificaties van de uitvinding zullen de vakman duidelijk zijn.

15 Zoals door de vakman direct zal worden begrepen is de inrichting volgens de uitvinding niet noodzakelijkerwijs beperkt tot toepassing met een celpopulatie waarin toegewijde cellen en/of een middel zoals hierin is beschreven is opgenomen, en is geschikt voor toepassing bij elke willekeurige procedure waarbij het mengen en incuberen van een fluïdum met een agens nodig is.
20

 Alle in bovengenoemde beschrijving genoemde publicaties zijn hierin onder aanhaling opgenomen. Diverse modificaties en variaties van de beschreven werkwijzen en systemen van de uitvinding zullen de vakman duidelijk zonder af te wijken van de omvang en het wezen van
25 de uitvinding, ofschoon de uitvinding is beschreven in samenhang met de specifieke voorkeursuitvoeringsvormen niet onterechterwijs dient te worden beperkt tot dergelijke specifieke uitvoeringsvormen. Inderdaad worden diverse modificaties van de beschreven wijzen voor het uitvoeren van de uitvinding die voor de vakman op het gebied van de
30 moleculaire biologie en verwante gebieden voor de hand liggen, geacht binnen de omvang van de navolgende conclusies te liggen.

TABEL I

KLINISCHE DIAGNOSE VAN PATIËNTEN EN EXPERIMENTELE
OMSTANDIGHEDEN VAN BLOEDMONSTERS, INCLUSIEF COULTER-TELLINGEN (WBC)
NA EN VOORAFGAAND AAN BEHANDELING VAN BLOEDMONSTERS MET DIVERSE
MONOKLONALE ANTILICHAMEN EN ANDERE AGENTIA

PATIËNT ID	DIAG- NOSE	EXPT. OMST.	WBC/L X10-9		%LYMF		#LYMF/L 10X-9		AGENS ML/ml
			B	A	B	A	B	A	
1	B-CLL	12 HR BIJ 22C	100	ND	86,1	ND	86,1	ND	ANTI-B 50
2	B-CLL	2 HR BIJ 22C	39,1	9,6	74,4	63,3	29,9	6,1	ANTI-B 50
		2 HR BIJ 22C	39,1	37,7	74,4	75,1	29,9	28,3	ANTI-B PE 50
3	B-CLL	6 HR BIJ 22C	39,5	9,3	71,9	67,2	28,3	6,2	ANTI-B 50
		6 HR BIJ 22C	29,5	37,7	71,9	72,5	28,3	27,4	ANTI-B PE 50
4	B-CLL	24 HR BIJ 22C	39	9,3	73	66,5	28,4	6,2	ANTI-B 50
		24 HR BIJ 22C	39	36,2	73	70,4	28,4	25,5	ANTI-B PE 50
5	B-CLL	24 HR BIJ 22C							ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-I 50 ANTI-B & TOXISCH AGENS 25+25
6	B-CLL	24 HR BIJ 22C							ANTI-B 50
7	B-CLL	24 HR BIJ 22C	170	128	95,4	91,1	16,9	11,6	ANTI-B 10
				178 130		94,2 90,4		16,8 11,9	ANTI-I 10 ANTI-B & TOXISCH AGENS 10+20
8	B-CLL	24 HR BIJ 22C	16	7	81,9	51,2	14	3,0	ANTI-B 20

PATIËNT ID	DIAG- NOSE	EXPT. OMST.	WBC/L X10-9		%LYMF		#LYMF/L 10X-9		AGENS ML/ml
			B	A	B	A	B	A	
9	B-CLL	12 HR BIJ 22C	+++	89,5	87	81,5 85,4	+++	76,2	ANTI-B 30 ANTI-I 30 ANTI-4 30 ANTI- I+II+4 10+10+10
10	B-CLL	2 HR BIJ 22C	19,3	ND	86	ND	16,7	ND	ANTI-B 30 ANTI-I 30
92	OUT- PATIËNT	2 HR BIJ 22C	5,4	ND	74,5	ND		ND	ANTI-B 20
87	OUT- PATIËNT	2 HR BIJ 22C	4,8	ND	59,3	ND		ND	ANTI-B 20
91	OUT- PATIËNT	2 HR BIJ 22C	4,2	ND	54,0	ND		ND	ANTI-B 20
21	OUT PATIËNT	2 HR BIJ 22C	3,9	ND	47,4	ND		ND	ANTI-B 20
34	OUT- PATIËNT	2 HR BIJ 22C	7,2	ND	20,0	ND		ND	ANTI-B 20
36	CMV- KIND	4 HR BIJ 22C	13,4	ND	7,3	ND		ND	ANTI-B 20
93	HIV+- KIND	4 HR BIJ 22C	5,6	ND	43,4	ND		ND	ANTI-B 20
BB/ST	40% BLAST. IN BLOED 6 DAGEN OUD	2 HR BIJ 22C 24 HR BIJ 22C	60,5	ND	20,2	ND	12,2	ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25
HIV25	AIDS	2 HR BIJ 22C	7,5	ND	34,8	ND	2,6	ND	ANTI-B 50 ANTI-A 50 ANTI-AB 25+25
43/BD	B-CEL- DEFICIËNT	4 HR BIJ 22C							ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20
0B/BD	B-CEL- DEFICIËNT	4 HR BIJ 22C							ANTI-B 20 ANTI-I 20 ANTI-4 20
HIV+	AIDS	6 HR BIJ 22C							ANTI-B 20 ANTI-I

PATIËNT ID	DIAG- NOSE	EXPT. OMST.	WBC/L X10-9 B A	%LYMF B A	#LYMF/L 10X-9 B A	AGENS ML/ml
IgA-D	IgA- DEFICIËNT	6 HR BIJ 22C				ANTI-B 20 ANTI-I 20

EXPT. OMST. : EXPERIMENTEL OMSTANDIGHEDEN

B : VOOR

A : NA

ANTI-B : monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de β -keten van het HLA-DR-antigen

ANTI-A : monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van de α -keten van het HLA-DR-antigen

ANTI-I : monoklonaal antilichaam tegen het homologe gebied van klasse I-antigenen

ANTI-AB : beide ANTI-B en ANTI-A samengevoegd

ANTI-4 : monoklonaal antilichaam tegen het CD4-antigen

ANTI-I+II+4 : ANTI-I en ANTI-B en ANTI-4 samengevoegd

Cytotoxisch agens : Cyclofosfoamide

ML/ml : microliter per ml

L : liter

TABEL 2

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE
AANDOENINGEN VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN BLOEDMONSTERS MET
MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN
HET HLA-DR MET CD19- EN CD3-MONOKLONALE ANTILICHAMEN

PATIËNT	% CD19+		% CD3+		%CD19+CD 3+		%CD3- CD19-		% CD19+HG CD3- FC+	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
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
HIV25	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
HIV+	1	1	10	14	0	0	89	87	0	0
IgA/D	10	1	21	25	2	3	67	71	0	0

B: voorafgaand aan de behandeling

A: na de behandeling

TABEL 3

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE AANDOENINGEN, VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN BLOEDMONSTERS MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN DE B-KETEN VAN HET HOMOLOGE GEBIED VAN HET HLA-DR MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD4 EN CD8

PATIËNT	%CD8+		%CD4+		%CD4+CD8+		%CD4-CD8-		CD4+LOW	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
1	2.8	16	2.9	11.4	0	3.2	93.1	67.6	0	0
2	6.2	13.2	9.1	24.3	0	9.4	78.7	46	5.8	6.3
3	7.2	13.1	7.4	23.9	0	8.2	78.8	48.1	6.3	6.6
4	10.1	24.2	7.6	24.9	0.3	2.8	77.5	42	4.6	5
5	2.9	16.2	1.8	7.6	0	2	95	62.3	0	0
6	ND	12	ND	8.1	ND	1.7	ND	75.7	ND	0
7	1.9	2.6	1.9	2.8	0	0	95.8	94.3	0	0
8	3.2	7	3.9	6.9	0.1	2	87.3	79.8	4.3	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
HIV25	24.1	24.9	0.8	1.1	1.3	5	70.2	69.3	2.9	3.8

TABEL 4

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE
AANDOENINGEN, VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN MONSTERS MET
MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR MET
MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD3 EN DR

PATIËNT	DR+		CD+		CD+DR+		DR-CD3-		DR+HCD3-	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
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	39.3	41.9	4.5	3.5	32.4	40.5	0	0
91	13.3	7.9	29.6	32.5	3.4	2.9	53.4	56.5	0	0
87	14.8	12.2	28.4	34.1	5.5	6.6	51.1	46.5	0	0
21	ND									
34	11.9	12.9	10.4	13.7	0.8	0.6	76.7	72.8	0	0
39	25.6	13.7	24.6	25.2	3	2.8	46.5	25.2	0	0
93	13.3	8.9	18.4	18.9	9.9	10.1	58.2	61.7	0	0
BB/ST	44.2	32.5	11.7	12.2	0.8	0.8	43	49.4	0	4.6

TABEL 5

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE
AANDOENINGEN, VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN BLOEDMONSTERS MET
MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN
HET HLA-DR MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD16+56 EN CD3

PATIËNTEN	CD56+&16		CD3+		CD56+&16+C D3+		CD56+&16-CD3-	
	B	A	B	A	B	A	B	A
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

TABEL 6

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE
AANDOENINGEN, VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN BLOED MET
MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN
HET HLA-DR MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD45 EN CD14

PATIËNTEN	CD45+H		CD45+L		CD45+CD14+	
	B	A	B	A	B	A
1	90.5	70.1	7.5	21.9	0.8	3.3
2	85.8	52.2	8.8	38.3	5.3	9.5
3	84.3	52.2	9.9	33.8	5.1	13.2
4	91.5	79.2	2.1	7	5.7	10.8
5	63.1	84.6	34.9	9.4	0.5	3.6
6	ND					
7	52.8	85.2	45.6	13.9	0.5	0.6
8	71.1	55	71.1	34.5	5.3	8.7
9	SEE					
10	79.7	47.3	16.3	48	2.1	1.9
92	61.7	64.7	27.4	26.6	5.9	3.6
91	49.4	49.2	40.4	44.3	6.5	3.2
87	52.4	61.5	36.1	28.7	7	6.5
21	45.8	43.3	44.3	47.6	6.2	3.3
34	24.4	24.6	54.8	59.6	13.3	9.7
39	48.7	46.3	30.5	42.1	14.5	8.8
93	SEE					
HIV+	22.6	26.9	66.8	63.5	6.8	6.7
IgA/D	47.4	59.8	41.9	33.3	5.9	4.1

TABEL 7

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL EN ANDERE
AANDOENINGEN, VOORAFGAAND AAN EN NA BEHANDELING VAN BLOED MET
MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN
HET HLA-DR MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD8 EN CD3

PATIËNTEN	CD8+		CD3+		CD8+CD 3+		CD8- CD3-	
	B	A	B	A	B	A	B	A
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

TABEL 8

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD45 EN CD14

TIJD	DR+CD45+CD14+r	CD45+L	CD45+H
2HR	81.7	8.2	8.2
6HR	80.7	8.1	10.6
24HR	79	1.1	18.4

TABEL 9

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD19 EN CD3

TIJD	CD19+DR+r	CD3+	CD3+DR+	CD19-CD3-DR-
2HR	87.4	10.1	1.8	10.7
6HR	75.5	10.4	3.1	10.7
24HR	74	11.7	2.9	11

TABEL 10

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD4 EN CD8

TIJD	CD8+& DR+r	CD4+	CD4+&CD8+&DR+r	CD4+DR+	CD4-CD8-DR-
2HR	77.6	6.8	5.4	1.3	8.8
6HR	75.8	6.7	6.4	1.8	9.3
24HR	77	6.4	4.8	1.9	11

TABEL 11

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD3 EN DR

TIJD	DR+	CD3+	CD3+DR+	CD3+DR-
2HR	75	9.5	4.2	10.9
6HR	74.8	8.8	4.8	10.9
24HR	ND	ND	ND	ND

TABEL 12

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD16&56 EN CD3

TIJD	CD56+&16+DR+r	CD3+	CD56+CD16+&CD3 +DR+r	CD56-CD16- &CD16-DR-
2HR	82.5	9.5	4.1	3.5
6HR	84.3	7.5	4.1	3.3
24HR	ND	ND	ND	ND

TABEL 13

IMMUUNFENOTYPERING VAN EEN PATIËNT MET B-CLL IN DE TIJD NA
BEHANDELING VAN BLOED MET EEN MET PE GECONJUGEERD MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR,
GEMETEN MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN CD8 EN CD3

TIJD	CD8+DR+	CD3+	CD8+CD+3&DR+r	CD8-CD3-DR-
2HR	76.2	6.6	6.7	10.6
6HR	76.5	6.2	6.2	10.3

TABEL 14

IMMUUNFENOTYPERING VAN PATIËNTEN MET B-CLL VOORAFGAAND EN NA BEHANDELING VAN BLOED MET MONOKLONALE ANTILICHAMEN TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE A-KETEN VAN HET HLA-DR, HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN VAN HET HLA-DR, DE TWEE MONOKLONALE ANTILICHAMEN GEZAMENLIJK, MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE B-KETEN PLUS CYCLOFOSFOAMIDE EN TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN KLASSE I-ANTIGENEN, GEMETEN IN DE TIJD

ID	CD19+					CD3+					CD19+CD3+					CD19-CD3-				
	B	A A	AB	A BC	Al	B	A A	AB	A BC	Al	B	A A	AB	A BC	Al	B	A A	AB	A BC	Al
5/6																				
2H	86	91	54	40	89	5	4	16	23	5	1	1	3	2	1	6	4	27	33	5
24	N	88	51	60	86	N	4	18	10	4	N	2	1	2	3	N	4	29	28	7
10																				
2H	77	N	59	N	80	7	N	13	N	7	1	N	1	N	0	14	N	26	N	12
09																				
24	8	N	N	N	6	32	N	N	N	38	1	N	N	N	1	59	N	N	N	56
43/ BD																				
6H	0	N	0	0	0	40	N	42	43	49	0	N	1	0	1	58	N	54	54	47
04/ BD																				
6H	0	N	0	0	0	49	N	41	45	46	0	N	3	1	3	43	N	42	44	41
HIV +																				
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 = voorafgaand aan; A = na; AB = na toevoeging van antilichaam tegen de β -keten; AA = Na toevoeging van antilichaam tegen de α -keten; ABC = na toevoeging van antilichaam tegen ofwel de α - ofwel de β -keten en cyclofosfoamide; Al = na toevoeging van antilichaam tegen Klasse I.

TABEL 15

CD8 EN CD4

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

TABEL 16

CD3 EN DR

ID	DR+					CD3+					CD3+DR+					CD3-DR-				
	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6																				
2H	N	90	54	N	87	N	4	12	N	4	N	2	10	N	3	N	5	22	N	5
10																				
2H	83	N	63	N	81	4	N	8	N	4	4	N	7	N	4	9	N	23	N	12
09																				
24	14	N	N	N	13	30	N	N	N	36	3	N	N	N	3	51	N	N	N	47

TABEL 17

CD16&56 EN CD3

	CD56+&16+					CD3+					CD56+&16+CD3+					CD56-&16-CD3-				
ID	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6																				
2H	N	0	13	N	4	N	5	9	N	5	N	1	3	N	1	N	94	74	N	90
10																				
2H	0	N	1	N	1	6	N	14	N	6	1	N	2	N	1	92	N	65	N	92
09																				
24	42	N	N	N	41	36	N	N	N	38	2	N	N	N	2	20	N	N	N	19

TABEL 18

CD45 EN CD14

	CD45+L					CD45+M					CD45+H					CD45+CD14+				
ID	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6																				
2H	0	0	5	10	0	44	43	50	50	32	55	43	50	31	67	1	1	1	2	0
10																				
2H	0	N	0	N	0	43	N	54	N	35	54	N	42	N	62	1	N	1	N	0
09																				
24	2	N	N	N	1	18	N	N	N	16	71	N	N	N	76	7	N	N	N	5
HIV+																				
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

TABEL 19

CD8 EN CD28

	CD8+					CD28+					CD8+CD28+					CD8-CD28-				
ID	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
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

TABEL 20

CD34 EN CD2

	CD34+					CD2+					CD34+CD2+					CD34-CD2-				
ID	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI	B	A	AB	A	AI
		A		BC			A		BC			A		BC			A		BC	
5/6																				
2H	N	1	34	N	N	N	6	13	N	N	N	3	30	N	N	N	90	21	N	N
24	N	1	6	9	N	N	7	23	4	N	N	3	33	43	N	N	87	34	34	N
HIV+																				
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	3	30	23	36	N	27	32	28	35	N
24	N	11	29	11	N	N	13	12	9	N	N	27	9	18	N	N	48	49	61	N

TABEL 21

FACs-analyse onder toepassing van menselijke van buffy-coat afkomstige cellen

		2 h	2 h	24 h	24 h	5 d	5d
		analyse	analyse	analyse	analyse	analyse	analyse
CD- merker	Eerste analyse	Onbehandelde cellen	Behandelde cellen	Onbehandelde cellen	Behandelde cellen	Onbehandelde cellen	Behandelde cellen
CD 45							
CD 38	54.9	55.6	30.1	51.8	52.8	13.0	5.4
CD34	0.6	0.5	11.5	9.7	8.0	0.4	25.1
CD10	0.2	0.0	0.9	1.9	1.8	0.0	0.2
CD19	13.2	0.0	15.1	11.1	2.3	8.7	0.7
CD34	1.8	13.1	0.4	13.0	9.1	0.4	25.8
CD3	56.3	62.6	29.7	46.9	69.2	79.8	63.4
CD117	0.3	0.6	0.0	1.3	0.8	0.2	0.1
CD34	1.8	0.6	7.4	6.4	6.0	0.2	24.6
CD71	1.5	0.4	0.0	4.8	3.9	0.2	42.9
GLYCA	5.4	2.3	10.1	3.6	2.8	3.8	1.8
CD34	1.3	0.6	14.3	12.5	8.9	0.4	24.3
CD90	18.4	12.6	0.0	9.3	5.0	0.1	0.3
AC133	0.1	0.0	2.0	0.3	0.4	0.0	0.1
CD34	1.5	0.6	11.9	10.8	7.7	0.0	13.2

De waarden zijn uitgedrukt als het percentage cellen die de merkers tot expressie brengen

KAART 1

IMMUUNFENOTYPISCHE WIJZIGINGEN VAN ONBEHANDELDE EN BEHANDELDE
BLOEDMONSTERS VAN PATIËNT (2, 3 & 4) MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM
TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE β -KETEN VAN HET HLA-DR-ANTIGEN,
GEMETEN IN DE TIJD

ZONDER	MET	FL1	FL2	TIJD
NIETS001	MET002	CD45	CD14	2 HR
GEEN001	WE002	CD45	CD14	6 HR
001001	002002	CD45	CD14	24 HR
NIETS003	MET004	CD3	CD19	2 HR
GEEN003	WE004	CD3	CD19	6 HR
001003	002004	CD3	CD19	24 HR
NIETS004	MET005	CD4	CD8	2 HR
GEEN004	WE005	CD4	CD8	6 HR
001004	002005	CD4	CD8	24 HR
NIETS005	MET006	CD3	DR	2 HR
GEEN005	WE006	CD3	DR	6 HR
001005	002006	CD3	DR	24 HR
NIETS006	MET007	CD3	CD56&16	2 HR
GEEN006	WE007	CD3	CD56&16	6 HR
001006	002007	CD3	CD56&16	24 HR
N003	W004	CD3	CD8	2 HR
GEEN007	WE008	CD3	CD8	6 HR
001007	002008	CD3	CD8	24 HR

KAART 1A

IMMUUNFENOTYPISCHE WIJZIGINGEN VAN ONBEHANDELDE EN BEHANDELDE
BLOEDMONSTERS VAN PATIËNT (2, 3 & 4) MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM
TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN DE β -KETEN VAN HET HLA-DR-ANTIGEN,
GECONJUGEERD AAN PE, GEMETEN IN DE TIJD

ID	FL1	FL2	TIJD
WL003	CD45	CD14	2HR
WEL003	CD45	CD14	6HR
003003	CD45	CD14	24HR
WL005	CD3	CD19	2HR
WEL005	CD3	CD19	6HR
003005	CD3	CD19	24HR
WL006	CD4	CD8	2HR
WEL006	CD4	CD8	6HR
003006	CD4	CD8	24HR
WL007	CD3	DR	2HR
WEL 007	CD3	DR	6HR
WL008	CD3	CD65&16	2HR
WEL 008	CD3	CD56&16	6HR
WL005	CD3	CD8	2HR
WEL009	CD3	CD8	6HR

KAART 2

IMMUUNFENOTYISCHE WIJZIGINGEN VAN BEHANDELD EN ONBEHANDELD BLOED VAN
PATIËNT (1) MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN
DE β -KETEN VAN HET HLA-DR ANTIGEN, DIT ANTILICHAAM EN
CYCLOFOSFOAMIDE, MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED
VAN DE α -KETEN VAN HET HLA-DR-ANTIGEN EN MONOKLONAAL ANTILICHAAM
TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN KLASSE I-ANTIGEN, GEMETEN IN DE TIJD

MET	ZONDER	FL1	FL2	TIJD
	NA001	CD45	CD14	2HR
A2B001: AB		CD45	CD14	2HR
A2A: AA		CD45	CD14	2HR
DNAA001:ABC		CD45	CD14	2HR
A1001: AI		CD45	CD14	2HR
	NC001	CD3	CD19	2HR
C2B001:AB		CD3	CD19	2HR
C2A001:AA		CD3	CD19	2HR
DNAC001:ABC		CD3	CD19	2HR
C1001: AI		CD3	CD19	2HR
A124H001:AI		CD3	CD19	24HR
A2B24H001: AB		CD3	CD19	24HR
A2A24H001:AA		CD3	CD19	24HR
A2BX24H001:ABC		CD3	CD19	24HR
	ND001	CD4	CD8	2HR
D2B001: AB		CD4	CD8	2HR
D2A001: AA		CD4	CD8	2HR
DNAD001:ABC		CD4	CD8	2HR
D1001: AI		CD4	CD8	2HR
D124H001:AI		CD4	CD8	24HR
D2BX24H001:ABC		CD4	CD8	24HR
D2B001: AB		CD4	CD8	24HR
D2A001: AA		CD4	CD8	24HR
E1001: AI		CD3	DR	2HR
E2B001: AB		CD3	DR	2HR
E2A001: AA		CD3	DR	2HR
F1001: AI		CD3	CD56&16	2HR
F2B001: AB		CD3	CD56&16	2HR
F2A001: AA		CD3	CD56&16	2HR
G1001: AI		CD28	CD8	2HR
G2A001: AA		CD28	CD8	2HR
G2B001: AB		CD28	CD8	2HR
H1001: AI		CD7	CD33&13	2HR
H2A001: AA		CD7	CD33&13	2HR

MET	ZONDER	FL1	FL2	TIJD
H2B001: AB		CD7	CD33&13	2HR
I2A001: AA		CD21	CD5	2HR
I2B001:AB		CD21	CD5	2HR
J2A001: AA		CD34	CD2	2HR
J2B001: AB		CD34	CD2	2HR
B2A24H001:AA		CD34	CD2	24HR
B2B24H001:AB		CD34	CD2	24HR
B2BX24H001: ABC		CD34	CD2	24HR
K2B001: AB		CD10	CD25	2HR
K2A001: AA		CD10	CD25	2HR

KAART 3

IMMUUNFENOTYPISCHE WIJZIGINGEN VAN ONBEHANDELD EN BEHANDELD BLOED VAN
PATIËNT (8) MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN
DE β -KETEN VAN HET HLA-DR-ANTIGEN

MET	ZONDER	FL1	FL2	TIJD
	AN001	CD45	CD14	2HR
A2001		CD45	CD14	2HR
	CN001	CD3	CD19	2HR
C2001		CD3	CD19	2HR
	DN001	CD4	CD8	2HR
D2001		CD4	CD8	2HR
	EN001	CD3	DR	2HR
E2001		CD3	DR	2HR
	FN001	CD3	CD56&16	2HR
F2001		CD3	CD56&16	2HR
	GN001	CD28	CD8	2HR
G2001		CD28	CD8	2HR
	HN001	CD7	CD5	2HR
H2001		CD7	CD5	2HR
	IN001	CD13	CD20	2HR
I2001		CD13	CD20	2HR
	JN001	CD45RA	CD25	2HR
J2001		CD45RA	CD25	2HR
	KN001	CD57	CD23	2HR
K2001		CD57	CD23	2HR

KAART 4

IMMUUNFENOTYPISCHE WIJZIGINGEN VAN ONBEHANDELDE EN BEHANDELDE
BLOEDMONSTERS VAN PATIËNT (10) MET MONOKLONAAL ANTILICHAAM TEGEN HET
HOMOLOGE GEBIED VAN DE β -KETEN VAN HET HLA-DR-ANTIGEN EN MONOKLONAAL
ANTILICHAAM TEGEN HET HOMOLOGE GEBIED VAN KLASSE I-ANTIGENEN

MET	ZONDER	FL1	FL2	TIJD
	CLL0001	CD45	CD14	2HR
CLL1001		CD45	CD14	2HR
CLL2001		CD45	CD14	2HR
	CLL0003	CD3	CD19	2HR
		CD3	CD19	2HR
CLL1003		CD3	CD19	2HR
CLL2003		CD3	CD19	2HR
	CLL0004	CD4	CD8	2HR
CLL1004		CD4	CD8	2HR
CLL2004		CD4	CD8	2HR
	CLL0005	CD3	DR	2HR
CLL1005		CD3	DR	2HR
CLL2005		CD3	DR	2HR
	CLL0006	CD3	CD56&16	2HR
CLL1006		CD3	CD56&16	2HR
CLL2006		CD3	CD56&16	2HR

C O N C L U S I E S

1. Inrichting voor het vormen en/of verhogen van het relatieve
aantal ongedifferentieerde cellen in een celpopulatie die toegewijde
cellen omvat, welke inrichting omvat een kamer, middelen voor het in
de kamer inbrengen van een celpopulatie die toegewijde cellen omvat,
5 middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die
toegewijde cellen omvat, middelen voor het in de kamer inbrengen van
een agens dat teweegbrengt dat de toegewijde cel zich
terugdifferentieert tot een ongedifferentieerde cel,
incubatiemiddelen voor het incuberen van het agens en de toegewijde
10 cellen, zodat een toegewijde cel zich terugdifferentieert tot een
ongedifferentieerde cel, meetmiddelen voor het meten van het volume
van de celpopulatie, middelen voor het uitvoeren van celtellingen en
voor het meten van de celconcentratie van de celpopulatie, en
rekenmiddelen voor het berekenen van het volume van het aan de kamer
15 toe te voegen agens.

2. Inrichting volgens conclusie 1, waarin een of meer
bestanddelen wegwerpbestanddelen kunnen zijn.

20 3. Inrichting volgens conclusie 1 of 2, waarin de middelen voor
het uitvoeren van celtellingen een Coulter-teller is of een andere
geschikte cytometer is.

4. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
25 de inrichting overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een
hoeveelheid van de celpopulatie uit een opslaghouder naar de kamer.

5. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een
30 van te voren bepaalde hoeveelheid van de celpopulatie uit een opslag-
houder naar de kamer.

6. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting aanvullende overdrachtsmiddelen omvat voor het over-
35 brengen van een volume agens naar de kamer, waarbij de aanvullende

overdrachtsmiddelen bij voorkeur een door een motor aangedreven injectiespuit zijn.

7. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
5 de inrichting aanvullende overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een berekend volume agens naar de kamer.

8. Inrichting volgens conclusies 6 of 7, waarin de aanvullende
overdrachtsmiddelen een door een motor aangedreven injectiespuit
10 zijn.

9. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting kooldioxidebeheersingsmiddelen omvat voor het beheersen
van de kooldioxideconcentratie in de kamer.
15

10. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting temperatuurbheersingsmiddelen omvat voor het beheersen
van de temperatuur in de kamer.

20 11. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting mengmiddelen omvat voor het in de kamer mengen van de
celpopulatie en agens.

12. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
25 de inrichting tijdmeetmiddelen omvat voor het meten van de incubatieperiode.

13. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting weergavemiddelen omvat voor het aan de gebruiker weer-
30 geven van de resterende tijdsduur van de incubatieperiode.

14. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting alarmmiddelen omvat om de gebruiker te waarschuwen voor
het voltooien van de incubatieperiode.
35

15. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de inrichting oogstmiddelen omvat voor het oogsten van de cellen uit
de kamer.

16. Inrichting volgens conclusie 15, waarin de oogstmiddelen de ongedifferentieerde cellen uit de kamer oogsten.

17. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin 5 de inrichting verwijderingsmiddelen omvat voor het uit de kamer in een opslaghouder verwijderen van een monster van cellen die ongedifferentieerde cellen omvat.

18. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin 10 de inrichting verzegelingsmiddelen omvat voor het verzegelen van een opslaghouder die een celpopulatie omvat, die ongedifferentieerde cellen omvat.

19. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin 15 de toegeweide cellen niet-kankercellen zijn.

20. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de toegeweide cellen gedifferentieerde cellen zijn.

20 21. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de toegeweide cellen toegeweide hematopoietische cellen zijn.

22. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de toegeweide cellen zijn gekozen uit CFC-T-cellen, CFC-B-cellen, 25 CFC-eosinecellen, CFC-Bas-cellen, CFC-GM-cellen, CFC-MEG-cellen, CFC-E-cellen, T-cellen en B-cellen.

23. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de ongedifferentieerde cellen pluripotente stamcellen zijn. 30

24. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de ongedifferentieerde cellen stamcellen zijn, gekozen uit de groep, bestaande uit hematopoietische stamcellen, neuronale stamcellen, epitheliale stamcellen, mesenchymale stamcellen, endodermale stamcel- 35 len en embryonale stamcellen.

25. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de ongedifferentieerde cellen worden gekenmerkt door een of meer van

de volgende benoemde oppervlakmerkers: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, AC133, CD90 en/of CD45-laag.

26. Inrichting volgens een van de conclusies 1-24, waarin de
5 ongedifferentieerde cellen worden gekenmerkt door de benoemde celoppervlakmerkers CD45⁻ en CD14⁻.

27. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
de ongedifferentieerde cellen MHC-klasse I⁺- en/of MHC-klasse II⁺-
10 cellen zijn.

28. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin
het agens samenwerkt met een receptor die bemiddelt in het invangen,
herkennen of presenteren van een antigeen aan het oppervlak van de
15 toegeweide cellen.

29. Inrichting volgens conclusie 28, waarin de receptor een
MHC-klasse I-antigeen of een MHC-klasse II-antigeen is.

20 30. Inrichting volgens conclusie 29, waarin het klasse I-anti-
geen een HLA-A-receptor, een HLA-B-receptor, een HLA-C-receptor, een
HLA-E-receptor, een HLA-F-receptor of een HLA-G-receptor is en het
klasse II-antigeen een HLA-DM-receptor, een HLA-DP-receptor, een
HLA-DQ-receptor of een HLA-DR-receptor is.

25

31. Inrichting volgens conclusie 30, waarin de receptor een
HLA-DR-receptor is.

32. Inrichting volgens conclusie 28, waarin de receptor een β -
30 keten met homologe gebieden omvat.

33. Inrichting volgens conclusie 32, waarin de receptor ten
minste de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR omvat.

35 34. Inrichting volgens conclusie 28, waarin het agens een an-
tilichaam tegen de receptor is.

35. Inrichting volgens conclusie 34, waarin het agens een mono-
klonaal antilichaam tegen de receptor is.

36. Inrichting volgens conclusies 34 of 35, waarin het antilichaam gekozen is uit de groep, bestaande uit monoklonaal antilichaam CR3/43 en het monoklonaal antilichaam TAL 1B5.

5

37. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin het agens de MHC-genexpressie moduleert.

38. Inrichting volgens conclusie 37, waarin het agens de expressie van MHC-klasse I⁺ en/of van de MHC-klasse II⁺ moduleert.

15

39. Inrichting volgens een van de voorgaande conclusies, waarin de celpopulatie die toegewijde cellen omvat een buffy-coat-bloedmonster is of afkomstig is van een buffy-coat-bloedmonster.

40. Inrichting voor het vormen en/of verhogen van het relatieve aantal ongedifferentieerde cellen in een celpopulatie die toegewijde cellen omvat, welke inrichting omvat een kamer, middelen voor het in de kamer inbrengen van een celpopulatie die toegewijde cellen omvat, middelen voor het in de kamer inbrengen van een agens dat teweeg kan brengen dat de toegewijde cel zich teruggedifferentieert tot een ongedifferentieerde cel, incubatiemiddelen voor het incuberen van het agens en de toegewijde cellen, zodat een toegewijde cel zich teruggedifferentieert tot een ongedifferentieerde cel, en mengmiddelen voor het in de kamer mengen van de celpopulatie en het agens, waarbij de mengmiddelen ten minste een peddelarm omvatten.

30

41. Inrichting volgens conclusie 40, waarin een of meer bestanddelen wegwerpbestanddelen kunnen zijn.

42. Inrichting volgens conclusie 40 of 41, waarin de middelen voor het uitvoeren van celtellingen een Coulter-teller of een andere geschikte cytometer is.

35

43. Inrichting volgens een van de conclusies 40-42, waarin de inrichting overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een hoeveelheid van de celpopulatie uit een opslaghouder naar de kamer.

44. Inrichting volgens een van de conclusies 40-43, waarin de inrichting overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een van te voren bepaalde hoeveelheid van de celpopulatie uit een opslaghouder naar de kamer.

5

45. Inrichting volgens een van de conclusies 40-44, waarin de inrichting aanvullende overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een volume agens naar de kamer, waarbij de aanvullende overdrachtsmiddelen bij voorkeur een door een motor aangedreven injectiespuit zijn.

10

46. Inrichting volgens conclusie 40-45, waarin de inrichting aanvullende overdrachtsmiddelen omvat voor het overbrengen van een berekend volume agens naar de kamer.

15

47. Inrichting volgens conclusie 45 of 46, waarin de aanvullende overdrachtsmiddelen een door een motor aangedreven injectiespuit zijn.

20

48. Inrichting volgens een van de conclusies 40-47, waarin de inrichting kooldioxidebeheersingsmiddelen omvat voor het beheersen van de kooldioxideconcentratie in de kamer.

49. Inrichting volgens een van de conclusies 40-48, waarin de inrichting temperatuurbeheersingsmiddelen omvat voor het beheersen van de temperatuur in de kamer.

25

50. Inrichting volgens een van de conclusies 40-49, waarin de inrichting tijdmeetmiddelen omvat voor het meten van de incubatieperiode.

30

51. Inrichting volgens een van de conclusies 40-50, waarin de inrichting weergavemiddelen omvat voor het aan de gebruiker weergeven van de resterende tijdsduur van de incubatieperiode.

35

52. Inrichting volgens een van de conclusies 40-51, waarin de inrichting alarmmiddelen omvat om de gebruiker te waarschuwen voor het voltooien van de incubatieperiode.

1017973

53. Inrichting volgens een van de conclusies 40-52, waarin de inrichting oogstmiddelen omvat voor het oogsten van de cellen uit de kamer.

5 54. Inrichting volgens conclusie 53, waarin de oogstmiddelen de ongedifferentieerde cellen uit de kamer oogsten.

55. Inrichting volgens een van de conclusies 40-54, waarin de inrichting verwijderingsmiddelen omvat voor het uit de kamer in een
10 opslaghouder verwijderen van een monster van cellen die ongedifferentieerde cellen omvat.

56. Inrichting volgens een van de conclusies 40-55, waarin de inrichting verzegelingsmiddelen omvat voor het verzegelen van een
15 opslaghouder die een celpopulatie omvat, die ongedifferentieerde cellen omvat.

57. Inrichting volgens een van de conclusies 40-56, waarin de toegewijde cellen niet-kankercellen zijn.
20

58. Inrichting volgens een van de conclusies 40-57, waarin de toegewijde cellen gedifferentieerde cellen zijn.

59. Inrichting volgens een van de conclusies 40-58, waarin de
25 toegewijde cellen toegewijde hematopoietische cellen zijn.

60. Inrichting volgens een van de conclusies 40-59, waarin de toegewijde cellen zijn gekozen uit CFC-T-cellen, CFC-B-cellen, CFC-eosinecellen, CFC-Bas-cellen, CFC-GM-cellen, CFC-MEG-cellen, CFC-E-
30 cellen, T-cellen en B-cellen.

61. Inrichting volgens een van de conclusies 40-60, waarin de ongedifferentieerde cellen pluripotente stamcellen zijn.

35 62. Inrichting volgens een van de conclusies 40-61, waarin de ongedifferentieerde cellen stamcellen zijn, gekozen uit de groep, bestaande uit hematopoietische stamcellen, neuronale stamcellen, epitheliale stamcellen, mesenchymale stamcellen, endodermale stamcellen en embryonale stamcellen.

63. Inrichting volgens een van de conclusies 40-62, waarin de ongedifferentieerde cellen worden gekenmerkt door een of meer van de volgende benoemde oppervlakmerkers: CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻, CD117, 5 AC133, CD90 en/of CD45-laag.

64. Inrichting volgens een van de conclusies 40-63, waarin de ongedifferentieerde cellen worden gekenmerkt door de benoemde celoppervlakmerkers CD45⁻ en CD14⁻.

10

65. Inrichting volgens een van de conclusies 40-64, waarin de ongedifferentieerde cellen MHC-klasse I⁺- en/of MHC-klasse II⁺-cellen zijn.

15 66. Inrichting volgens een van de conclusies 40-65, waarin het agens samenwerkt met een receptor die bemiddelt in het invangen, herkennen of presenteren van een antigeen aan het oppervlak van de toegewijde cellen.

20 67. Inrichting volgens conclusie 66, waarin de receptor een MHC-klasse I-antigeen of een MHC-klasse II-antigeen is.

68. Inrichting volgens conclusie 67, waarin het klasse I-antigeen een HLA-A-receptor, een HLA-B-receptor, een HLA-C-receptor, een 25 HLA-E-receptor, een HLA-F-receptor of een HLA-G-receptor is en het klasse II-antigeen een HLA-DM-receptor, een HLA-DP-receptor, een HLA-DQ-receptor of een HLA-DR-receptor is.

69. Inrichting volgens conclusie 68, waarin de receptor een 30 HLA-DR-receptor is.

70. Inrichting volgens conclusie 66, waarin de receptor een β -keten met homologe gebieden omvat.

35 71. Inrichting volgens conclusie 70, waarin de receptor ten minste de homologe gebieden van de β -keten van HLA-DR omvat.

72. Inrichting volgens conclusie 66, waarin het agens een antilichaam tegen de receptor is.

73. Inrichting volgens conclusie 72, waarin het agens een monoklonaal antilichaam tegen de receptor is.

5 74. Inrichting volgens conclusie 72 of 73, waarin het antilichaam gekozen is uit de groep, bestaande uit monoklonaal antilichaam CR3/43 en het monoklonaal antilichaam TAL 1B5.

10 75. Inrichting volgens een van de conclusies 40-74, waarin het agens de MHC-genexpressie moduleert.

76. Inrichting volgens conclusie 75, waarin het agens de expressie van MHC-klasse I⁺ en/of van de MHC-klasse II⁺ moduleert.

15 77. Inrichting volgens een van de conclusies 40-76, waarin de celpopulatie die toegewijde cellen omvat een buffy-coat-bloedmonster is of afkomstig is van een buffy-coat-bloedmonster.

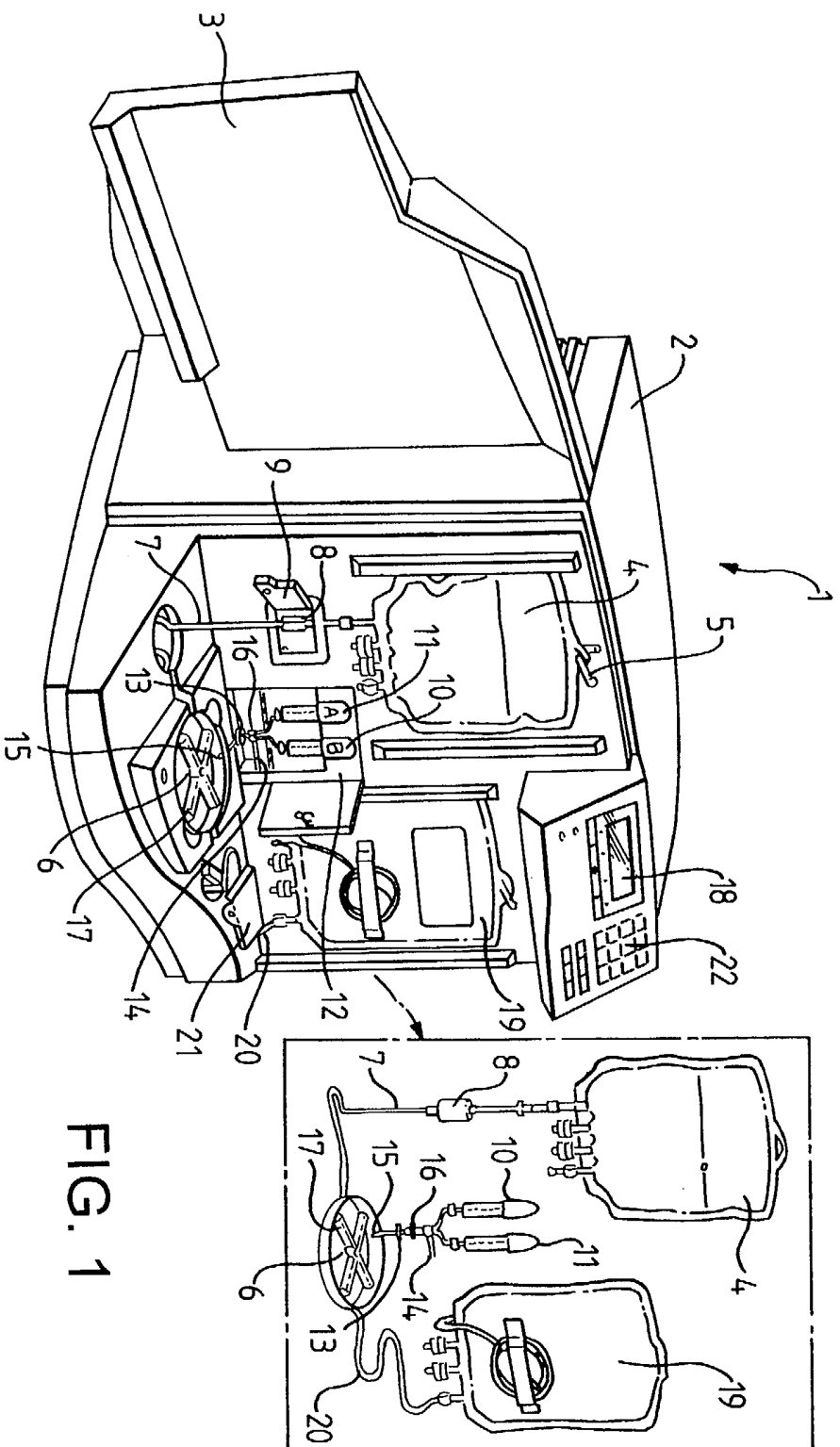


FIG. 1

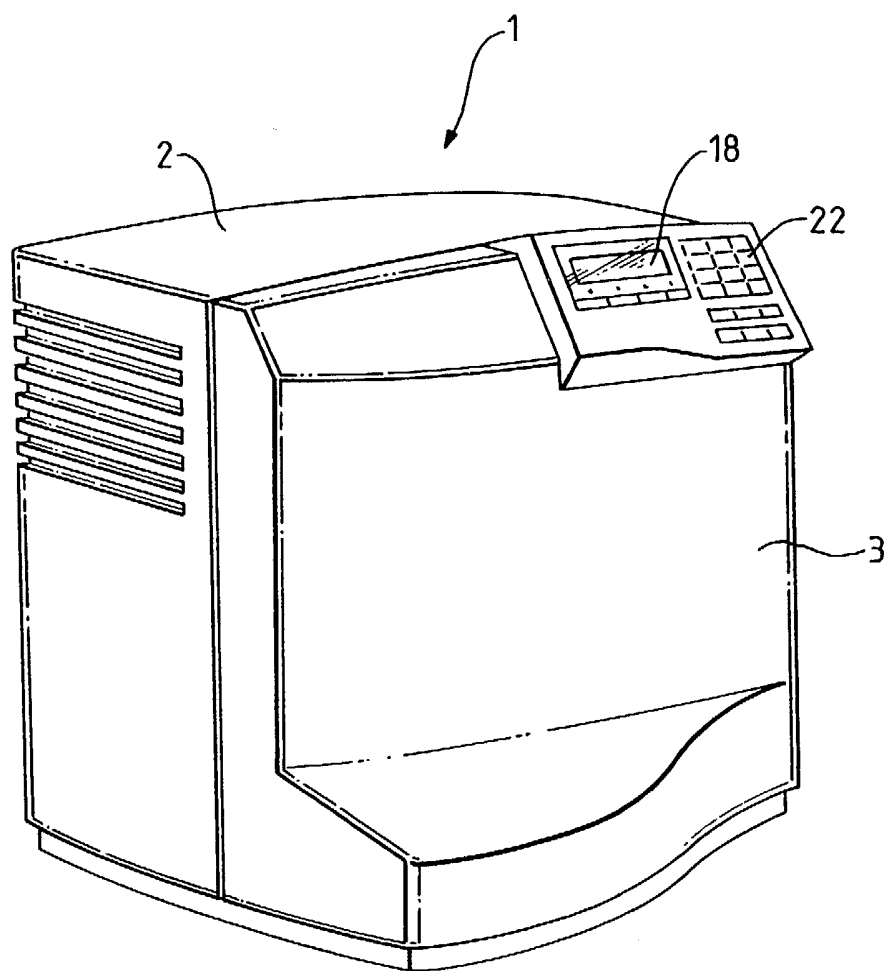


FIG. 2

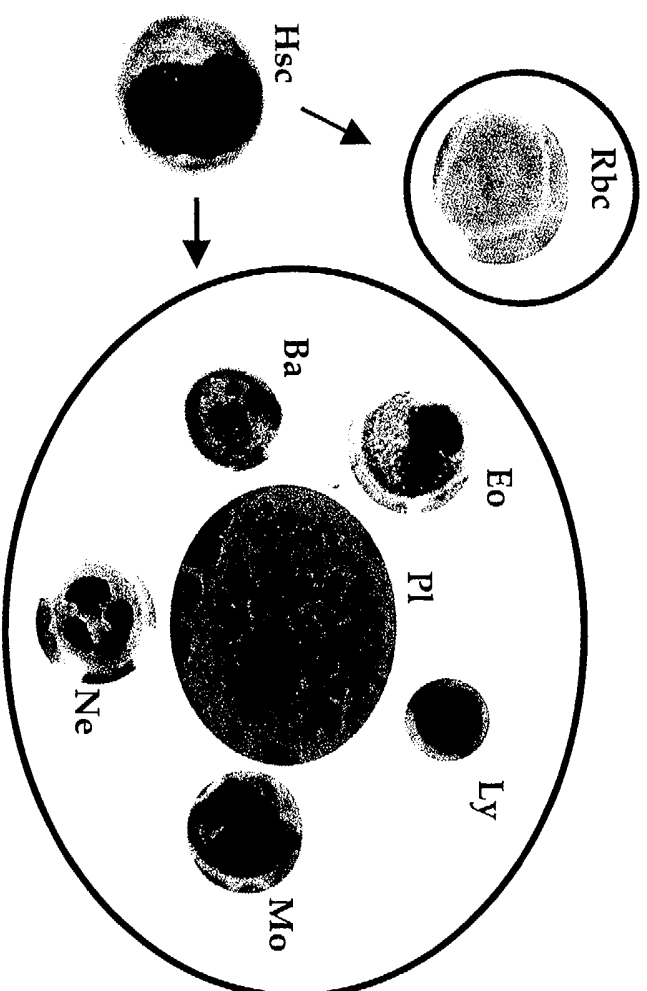
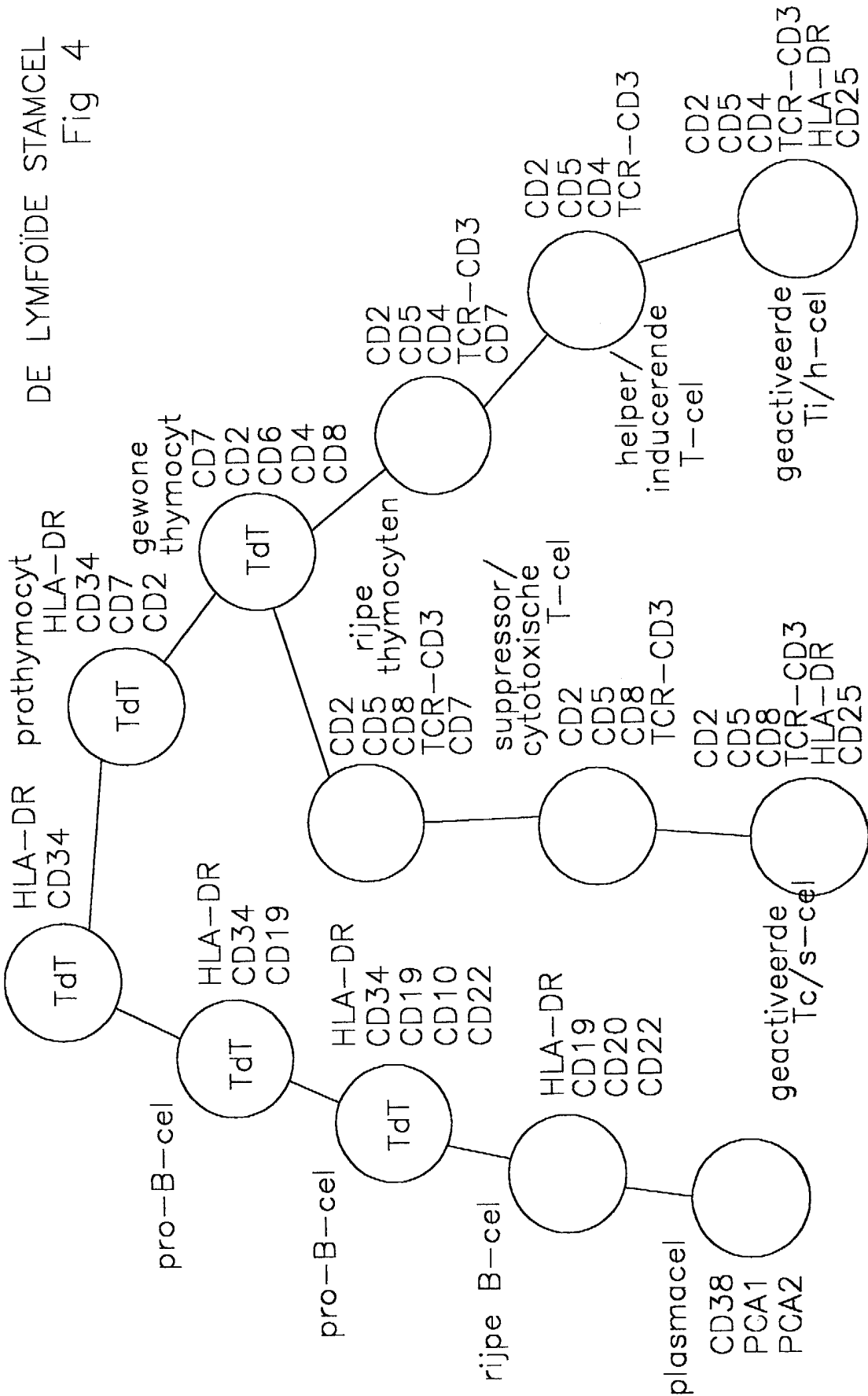
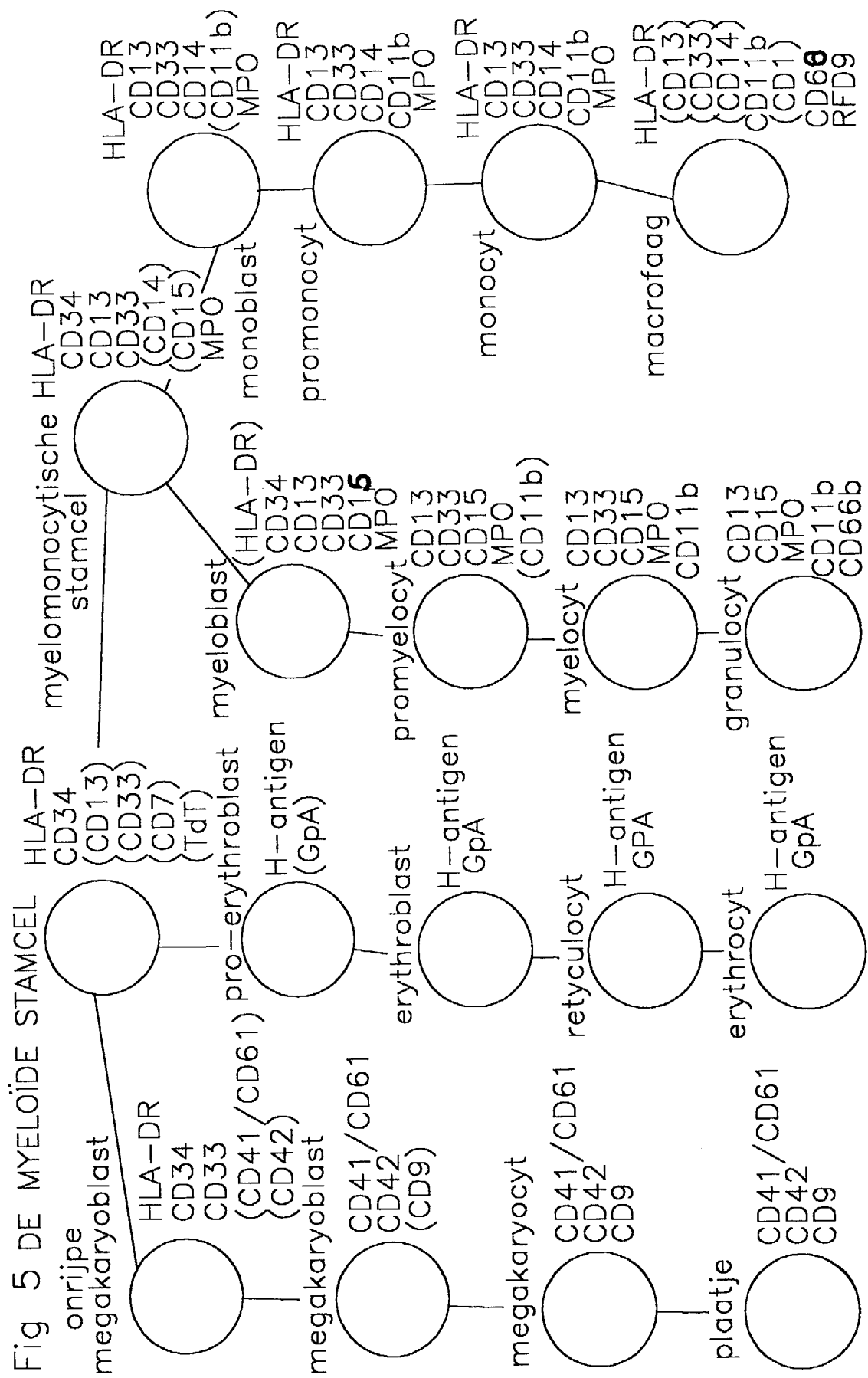


FIG. 3

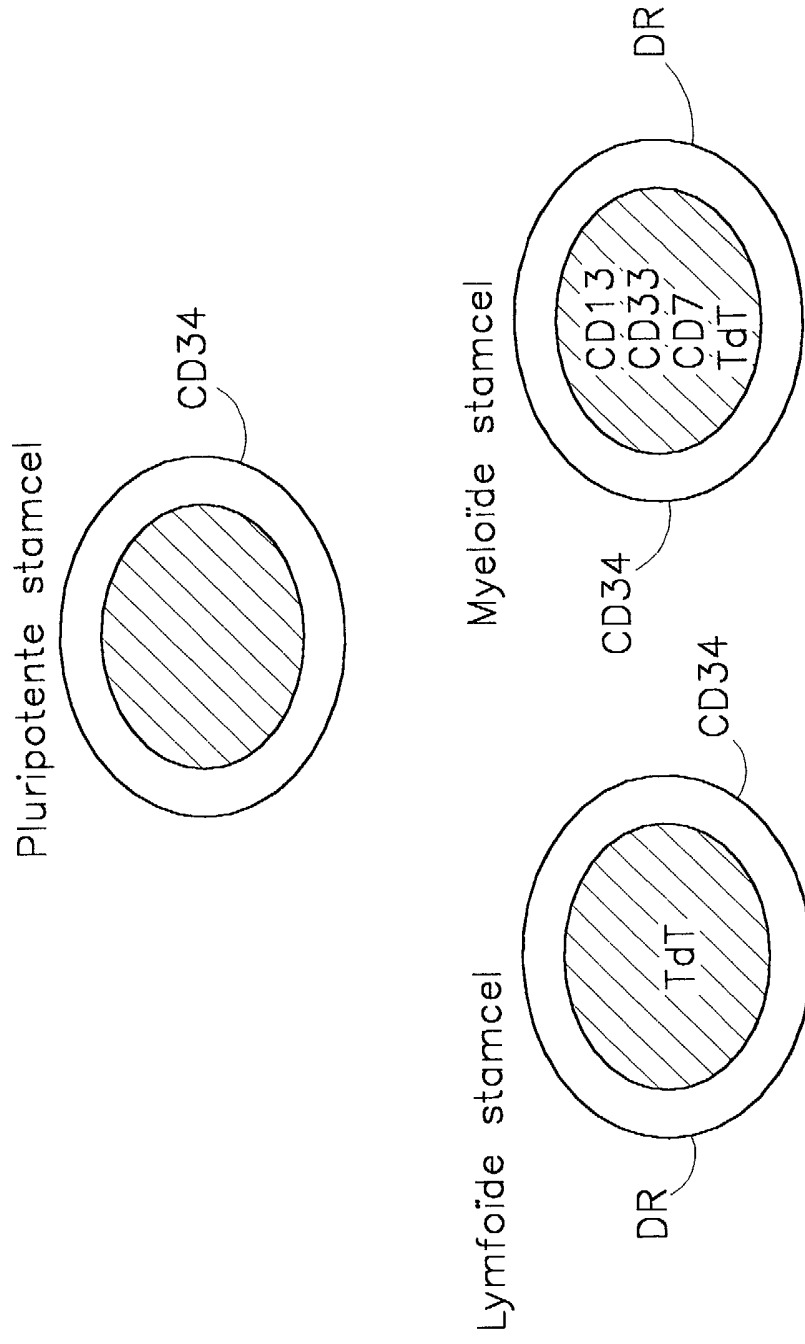


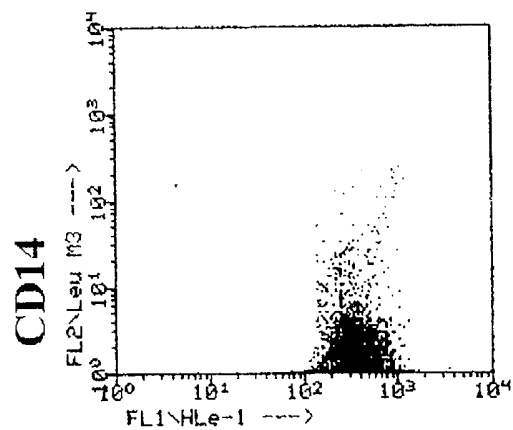
DE LYMFÖIDE STAMCEL
Fig 4



DE LYMFO-HEMATOPOÏETISCHE
VOORLOPERCELLEN

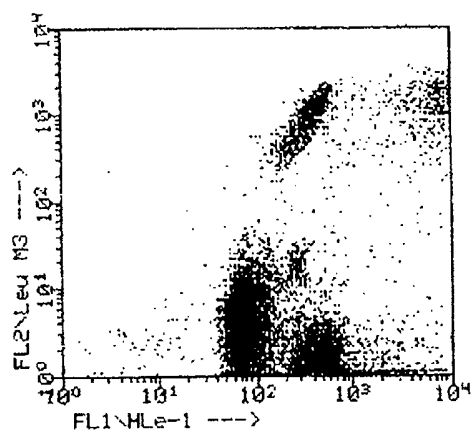
Fig 6





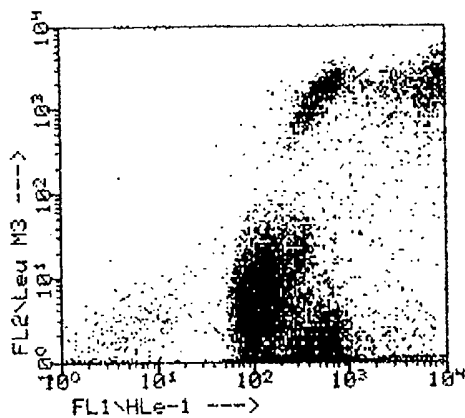
VOOR

#3:WITH002



2 UUR CR3/43

#3:WE002



24 UUR CR3/43

CD45

FIG. 7

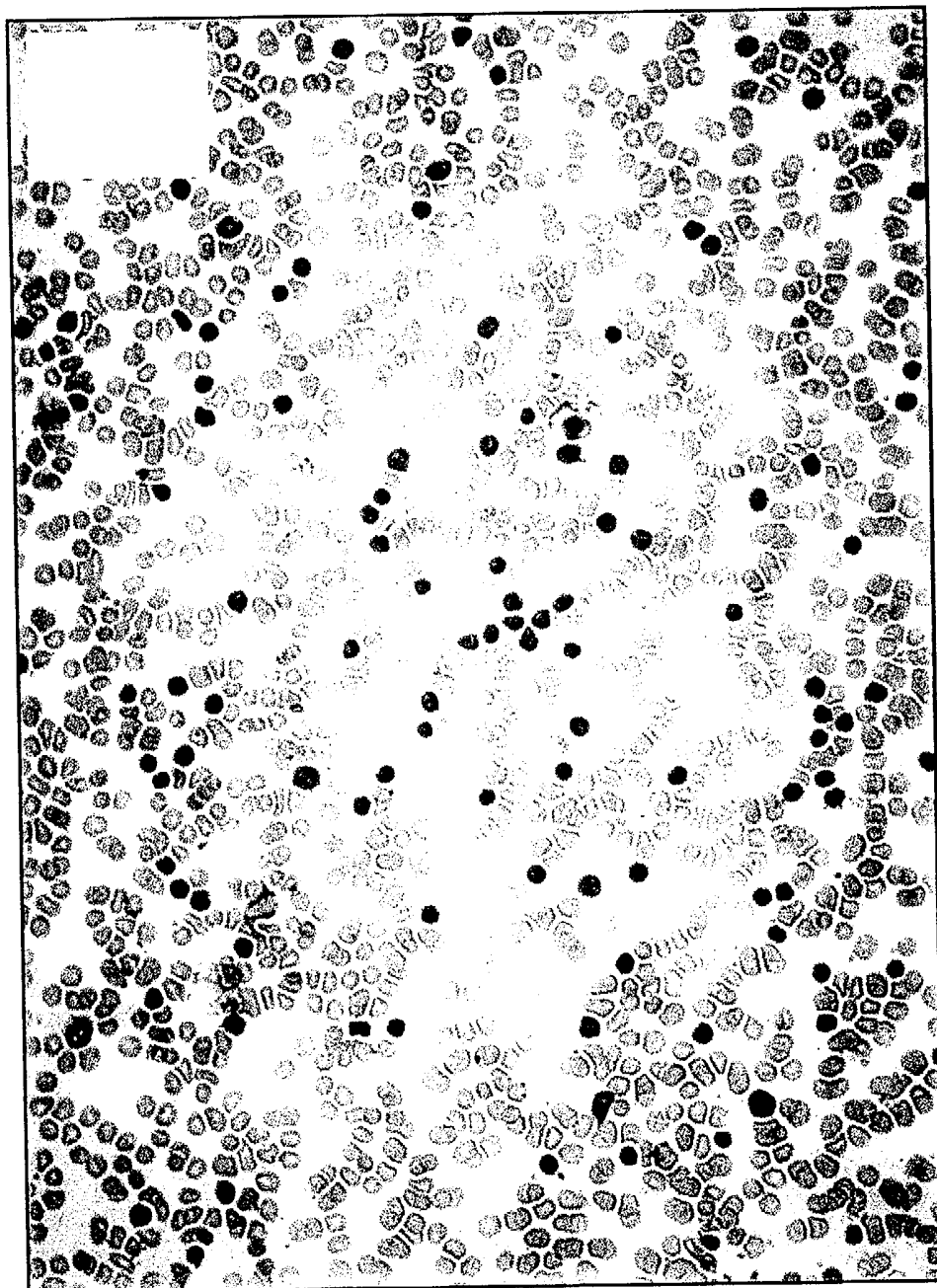


FIG. 8

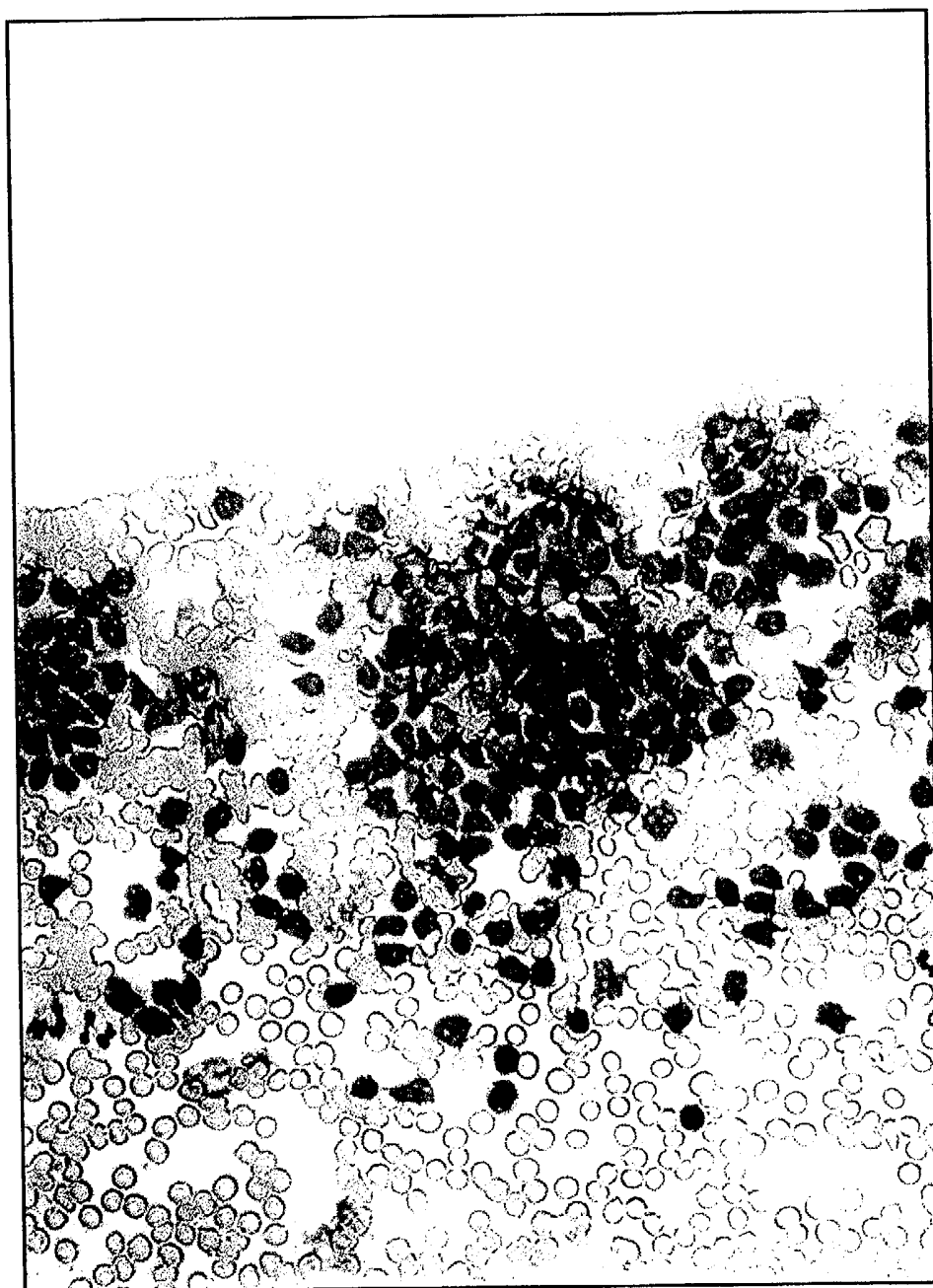


FIG. 9

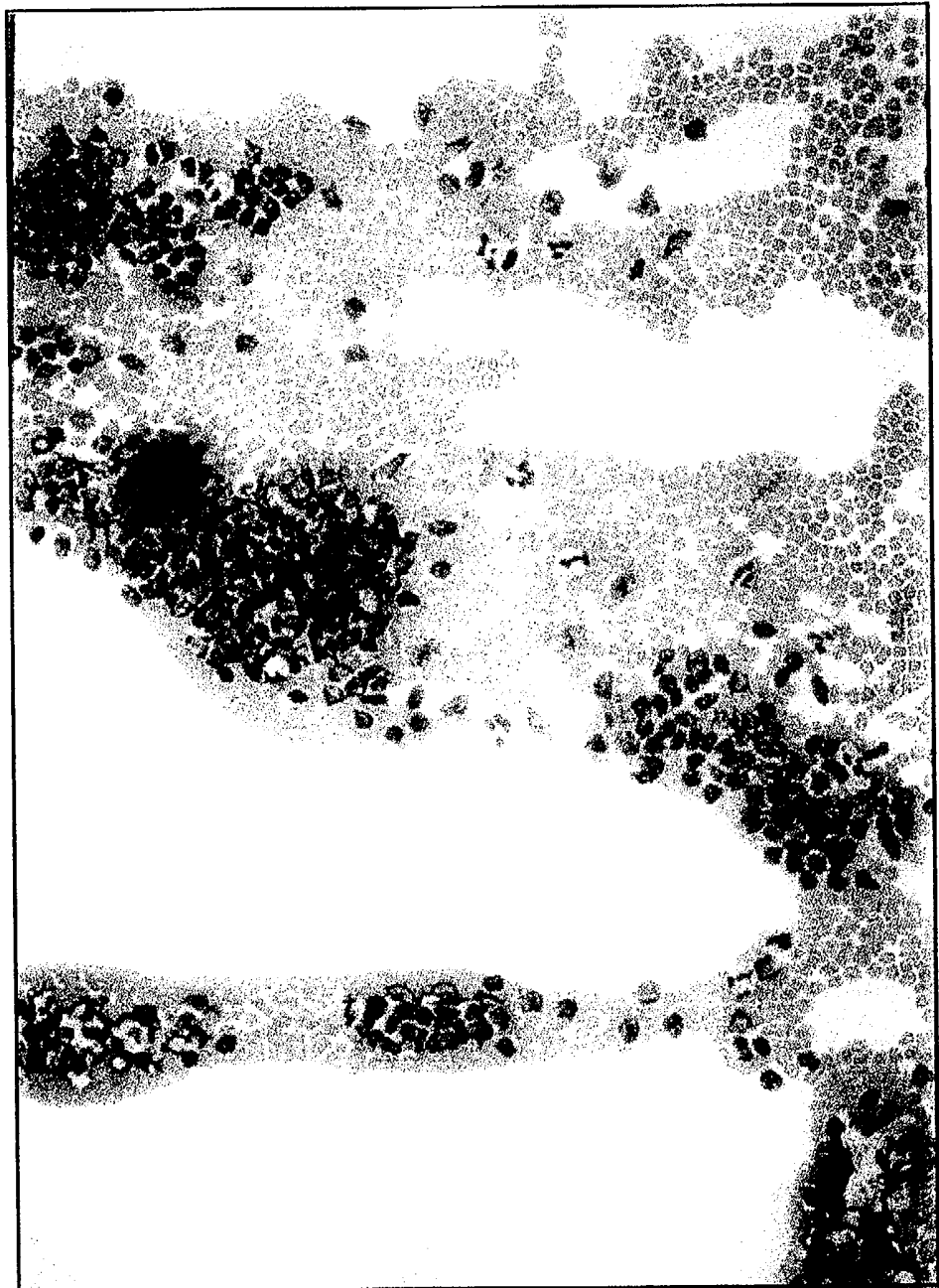


FIG. 10

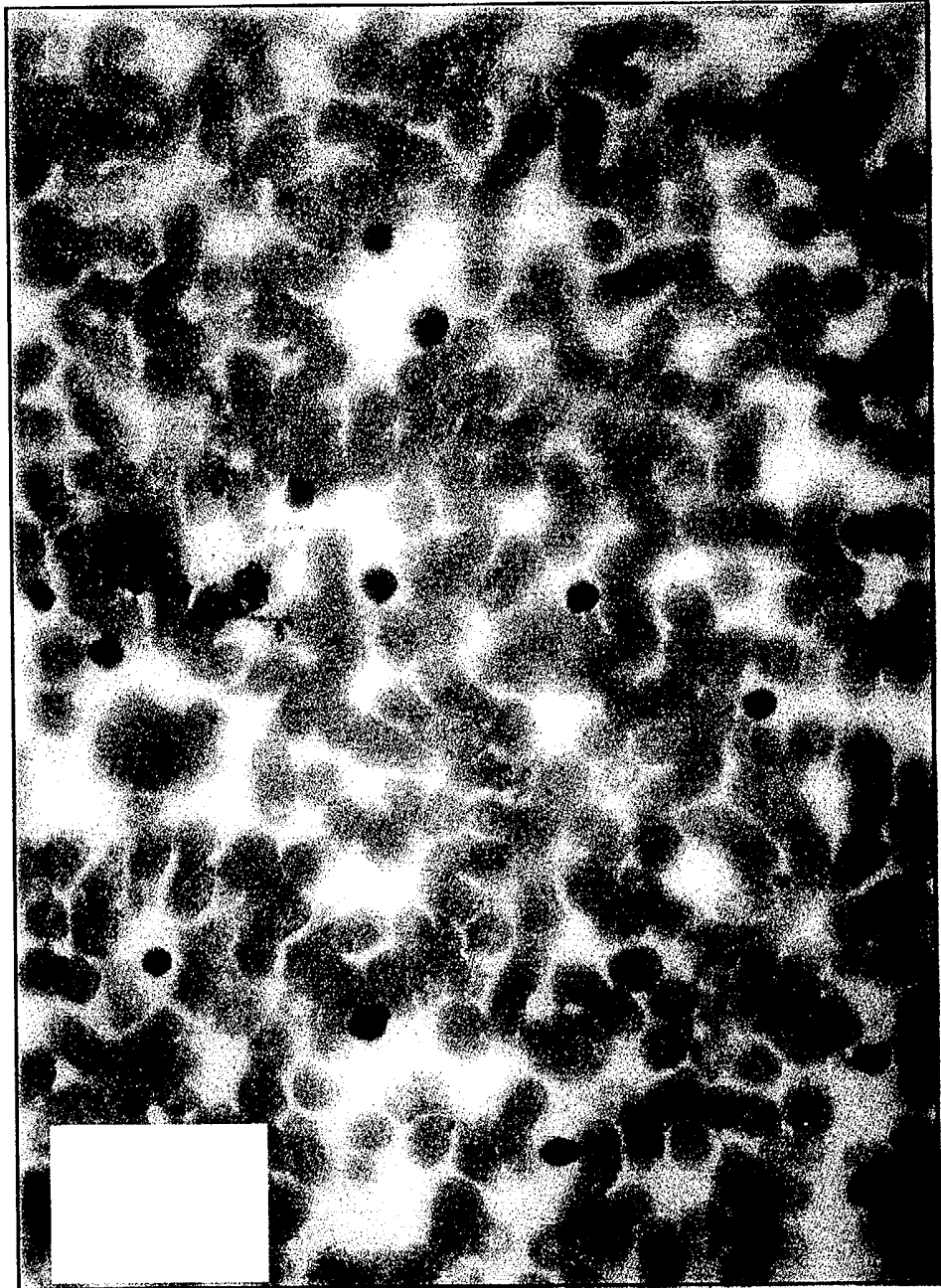


FIG. 11

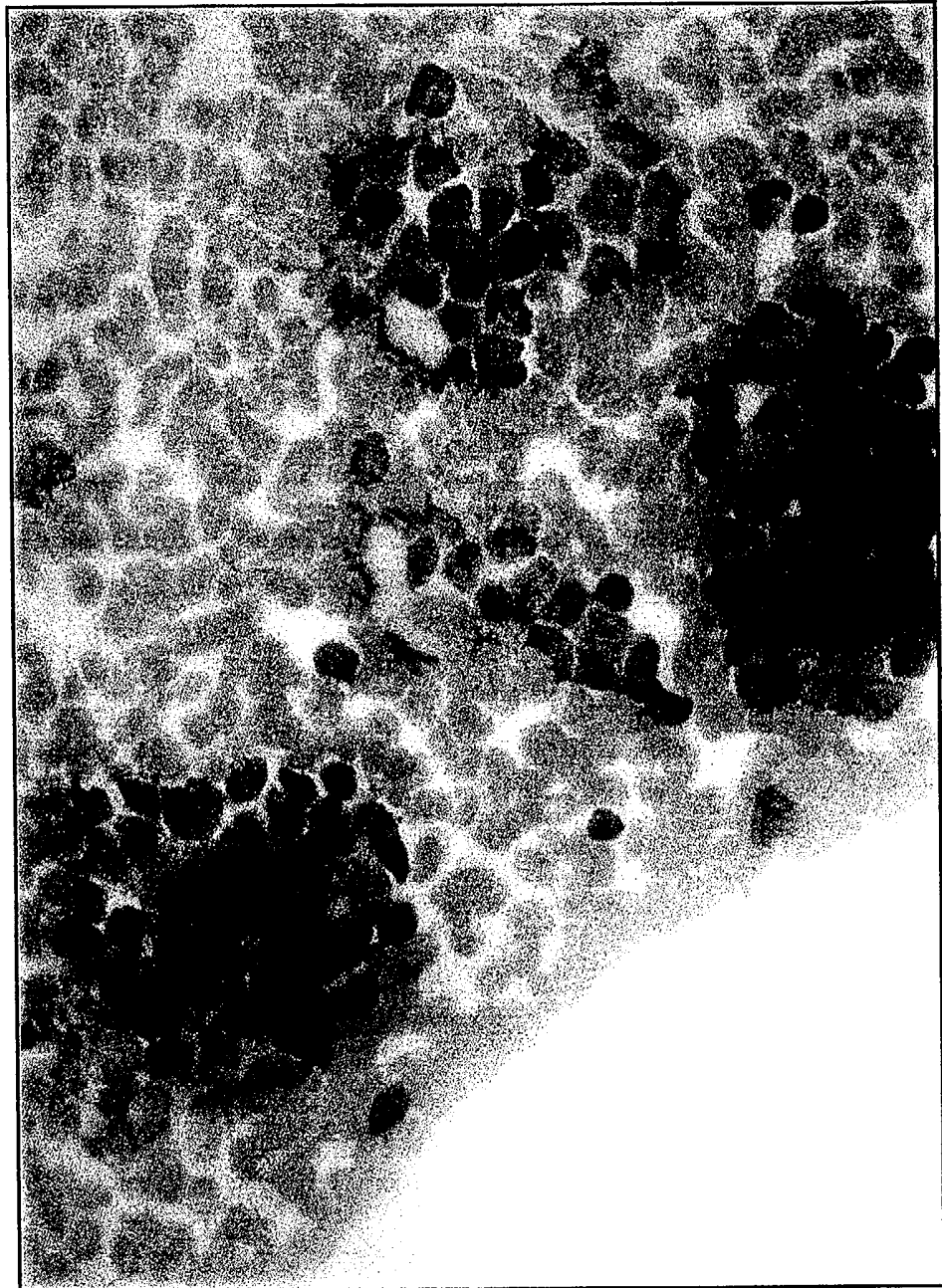


FIG. 12

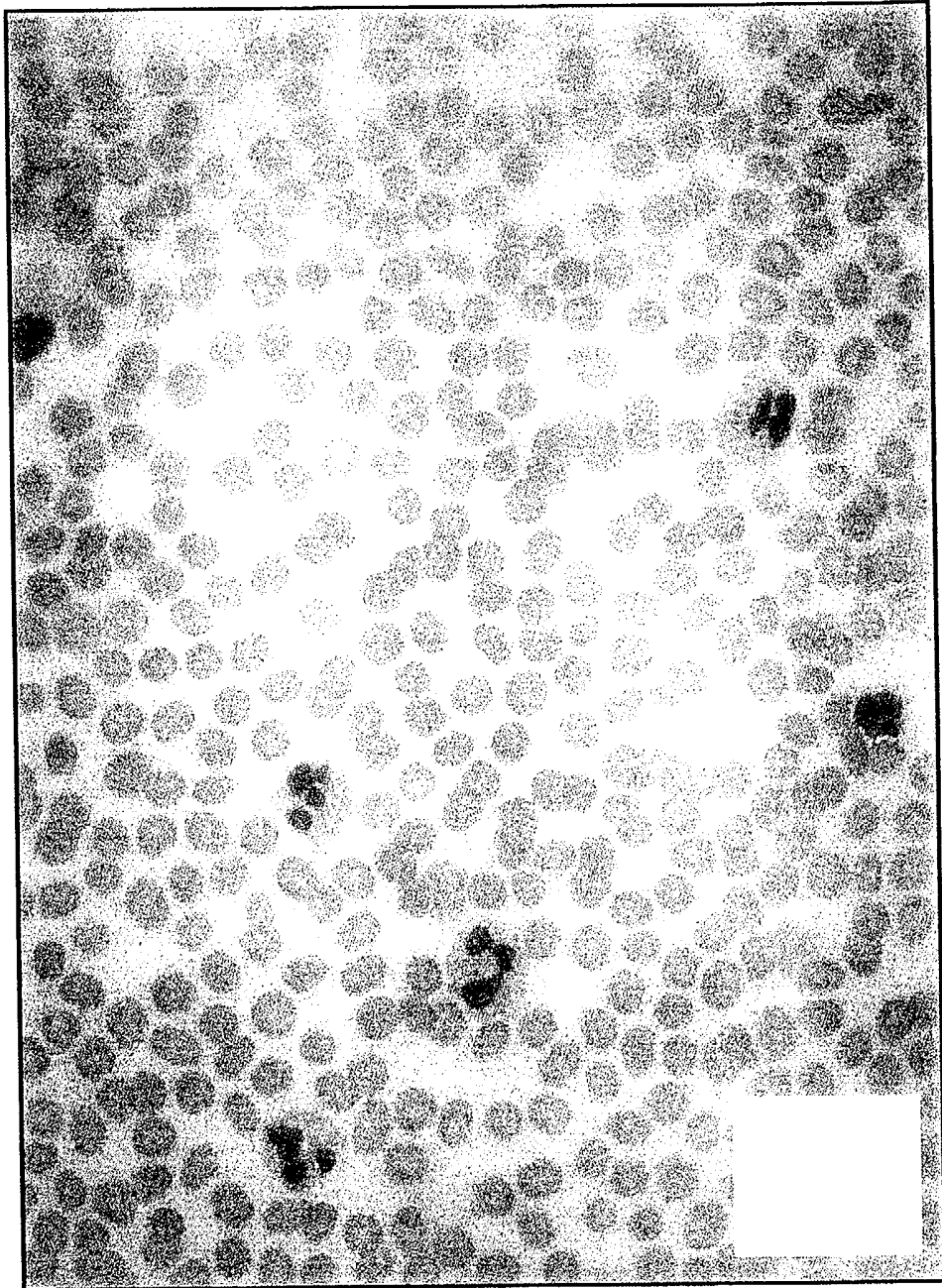


FIG. 13

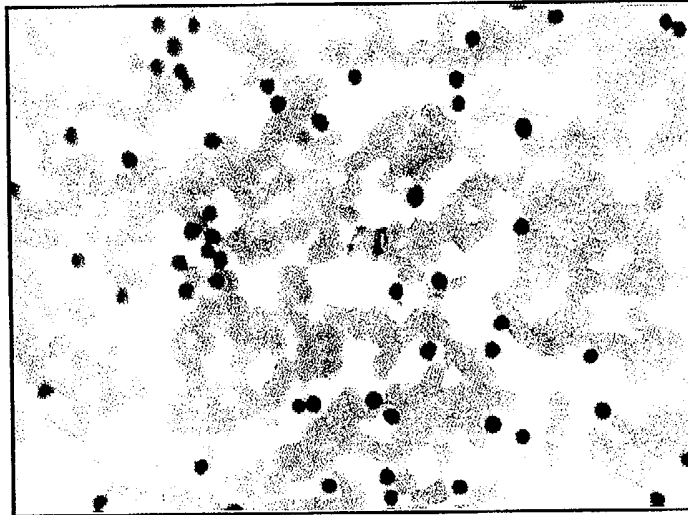


FIG. 14A

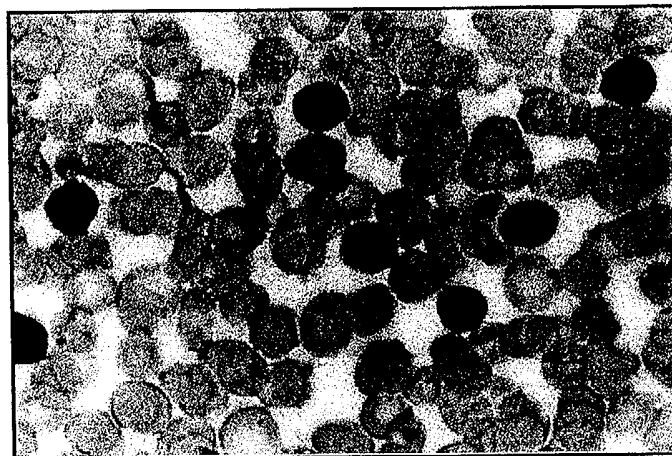


FIG. 14B

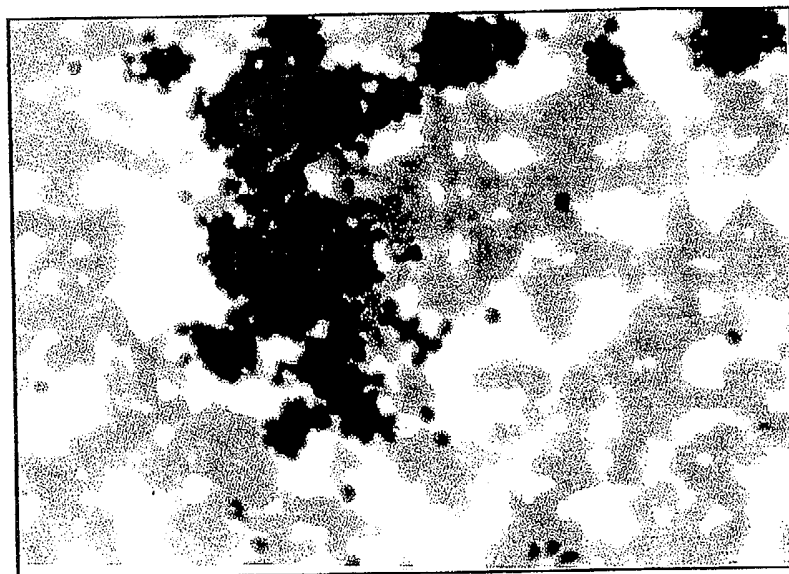


FIG. 15A

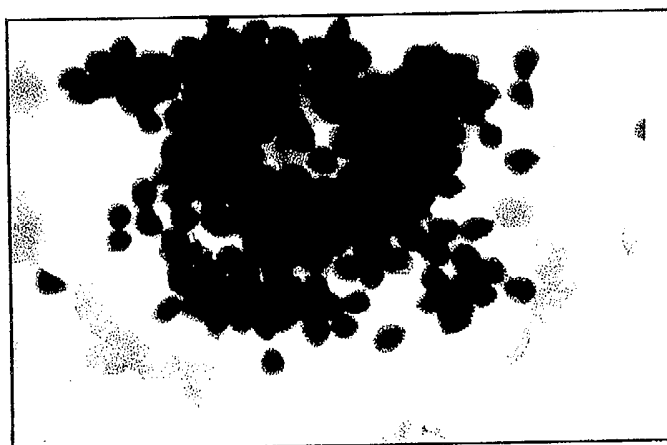


FIG. 15B



FIG. 15C

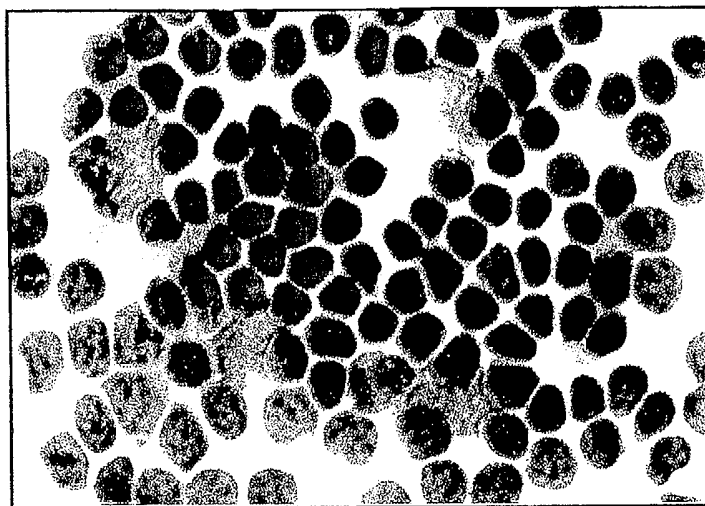


FIG. 16A



FIG. 16B

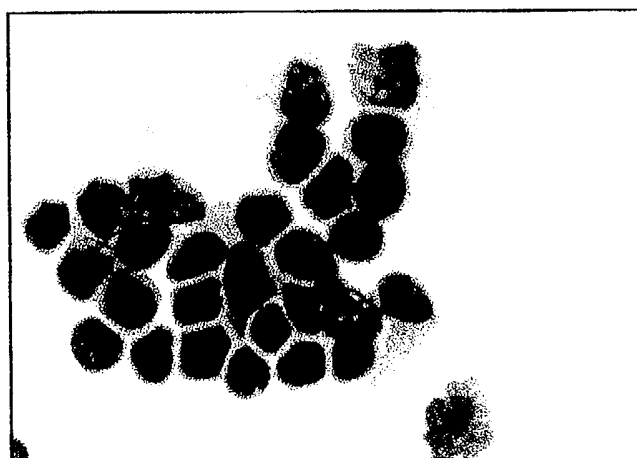


FIG. 16C

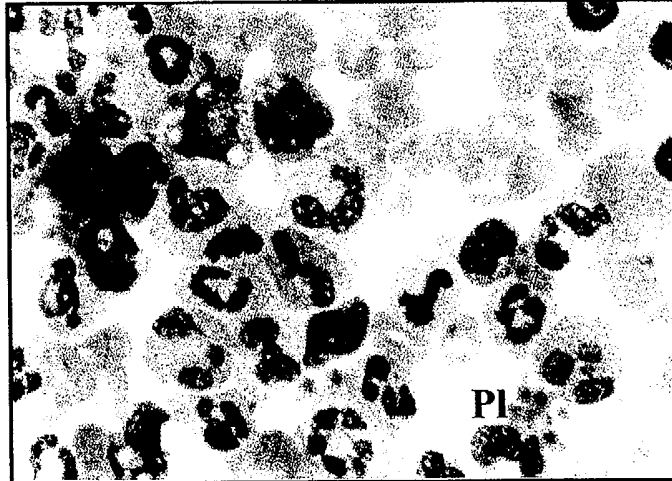


FIG. 17A



FIG. 17B

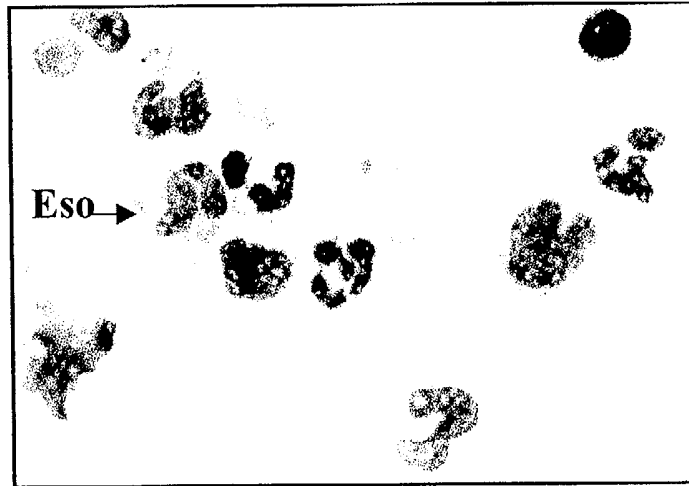


FIG. 17C

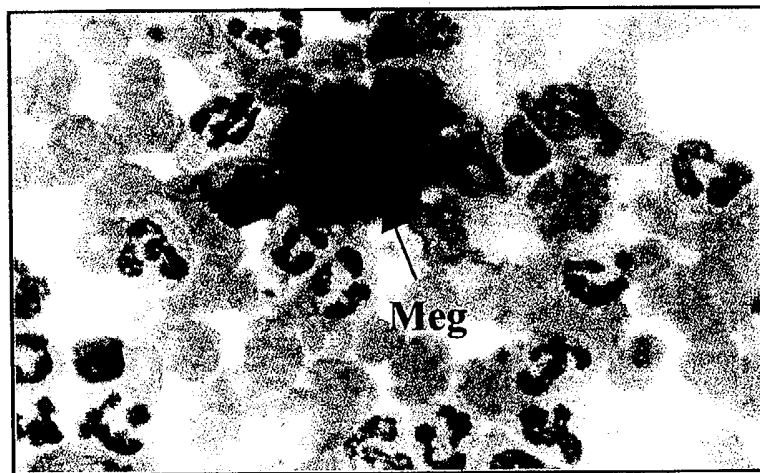


FIG. 17D

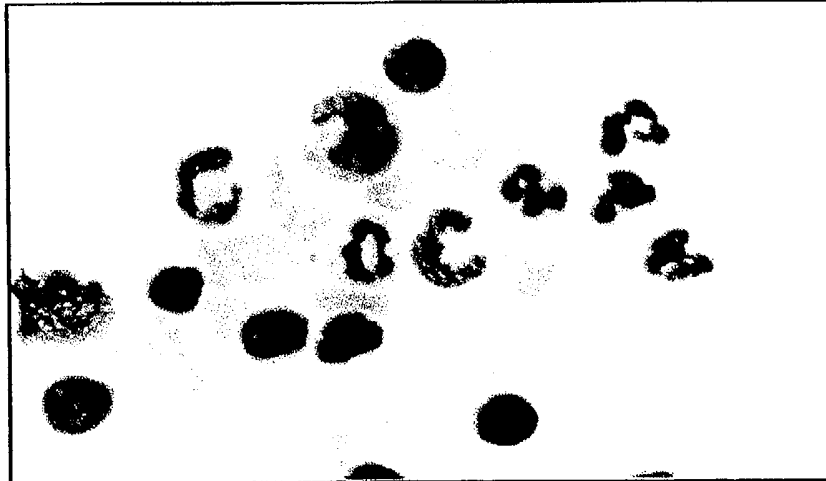


FIG. 17E

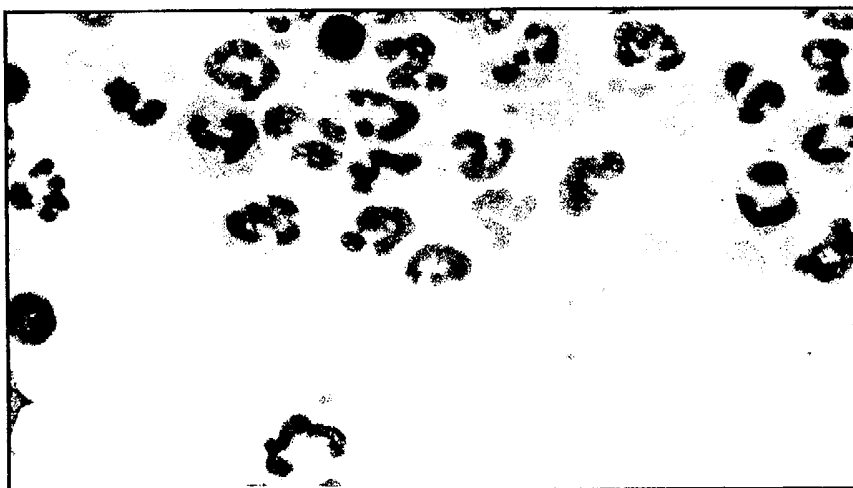


FIG. 17F

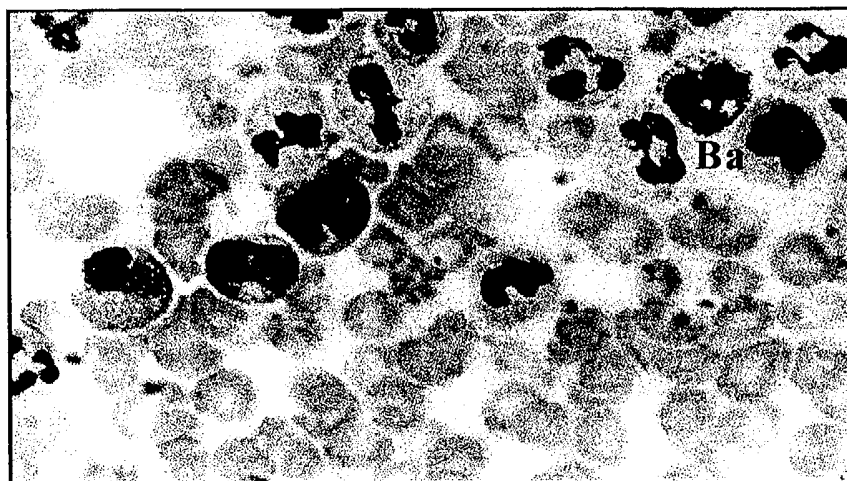


FIG. 17G

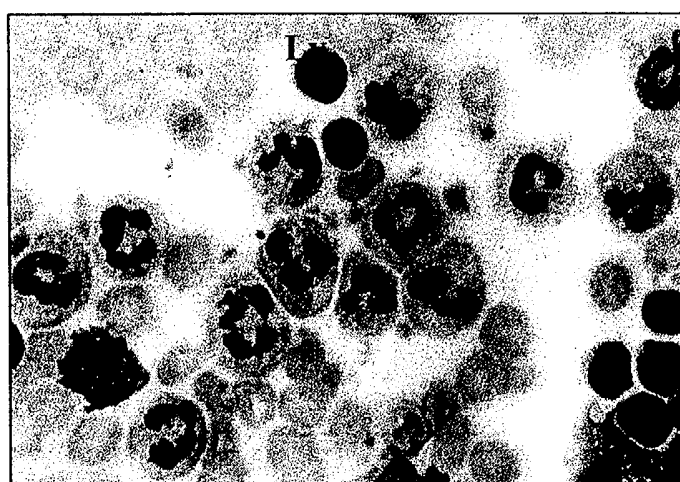


FIG. 17H

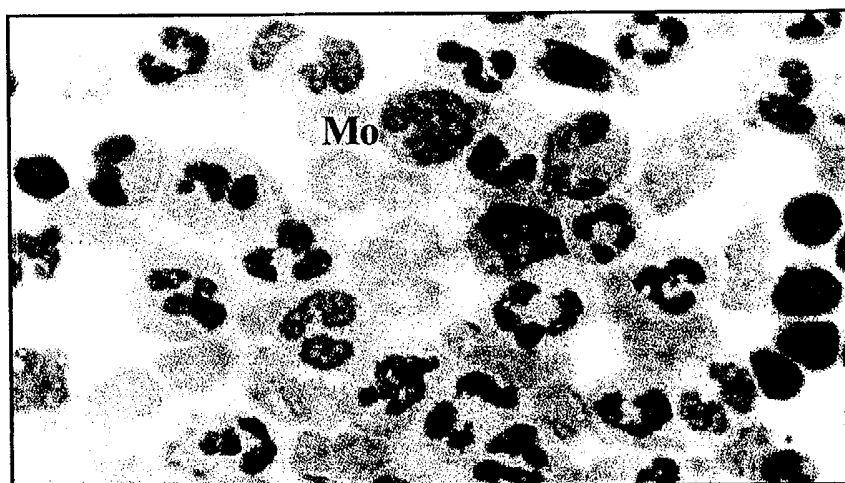


FIG. 17I

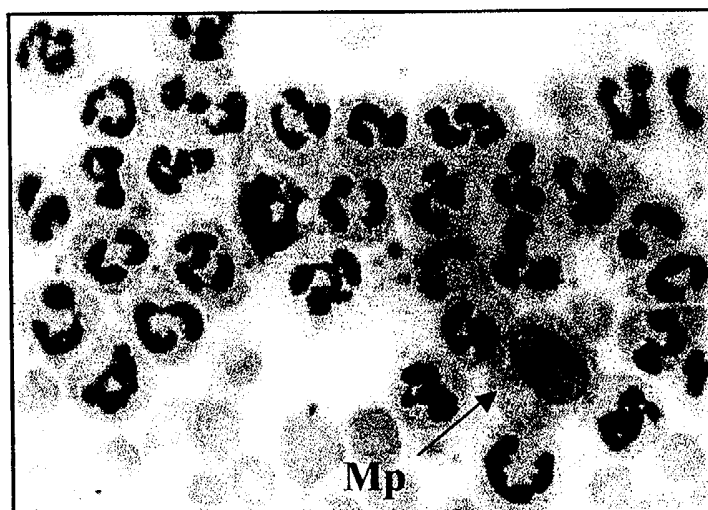


FIG. 17J

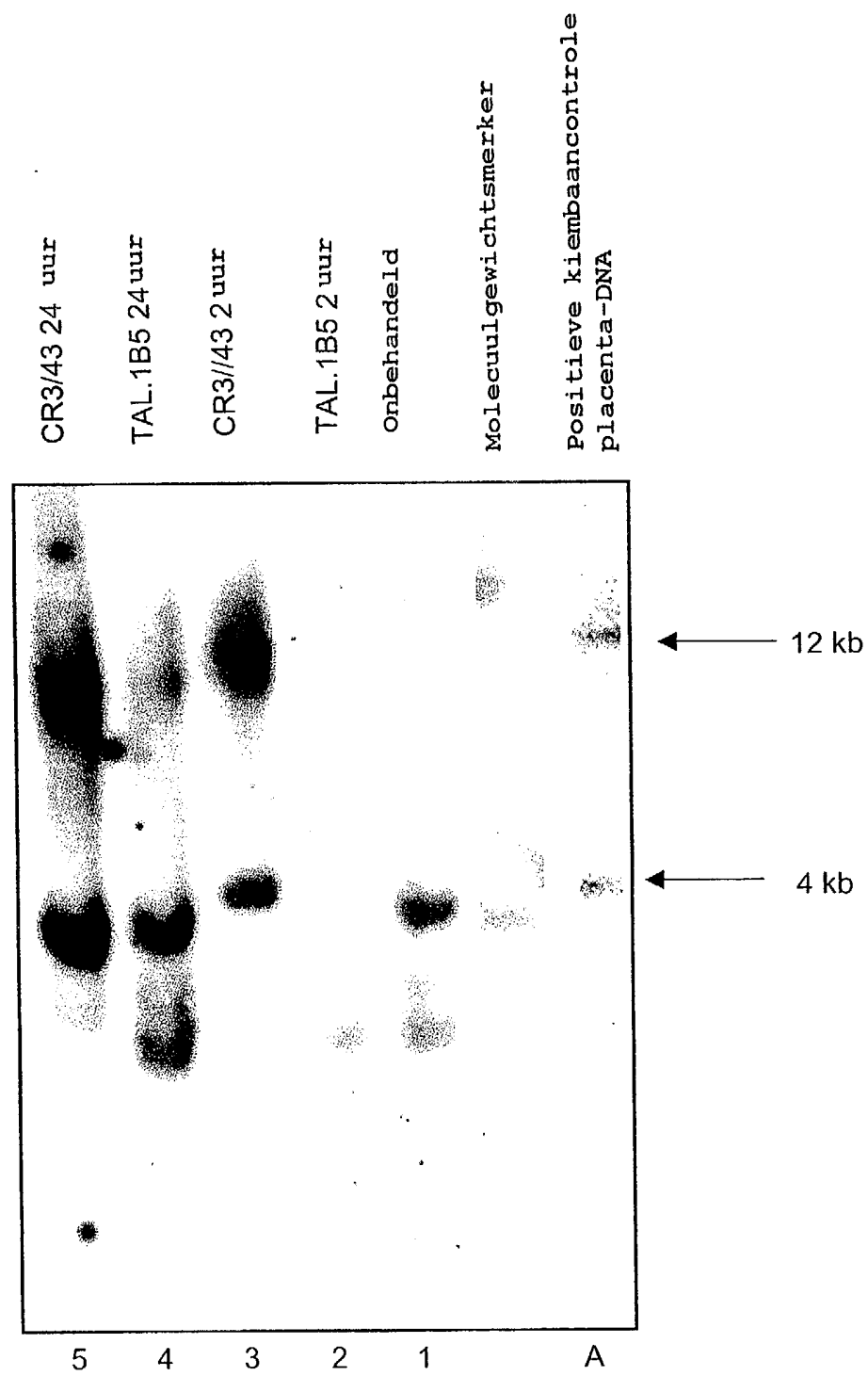
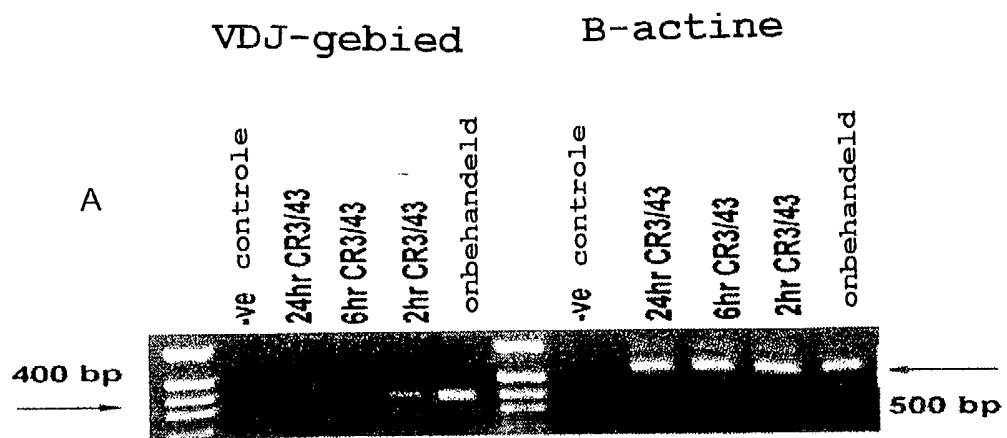


FIG. 18



IgH-genherrangschikking

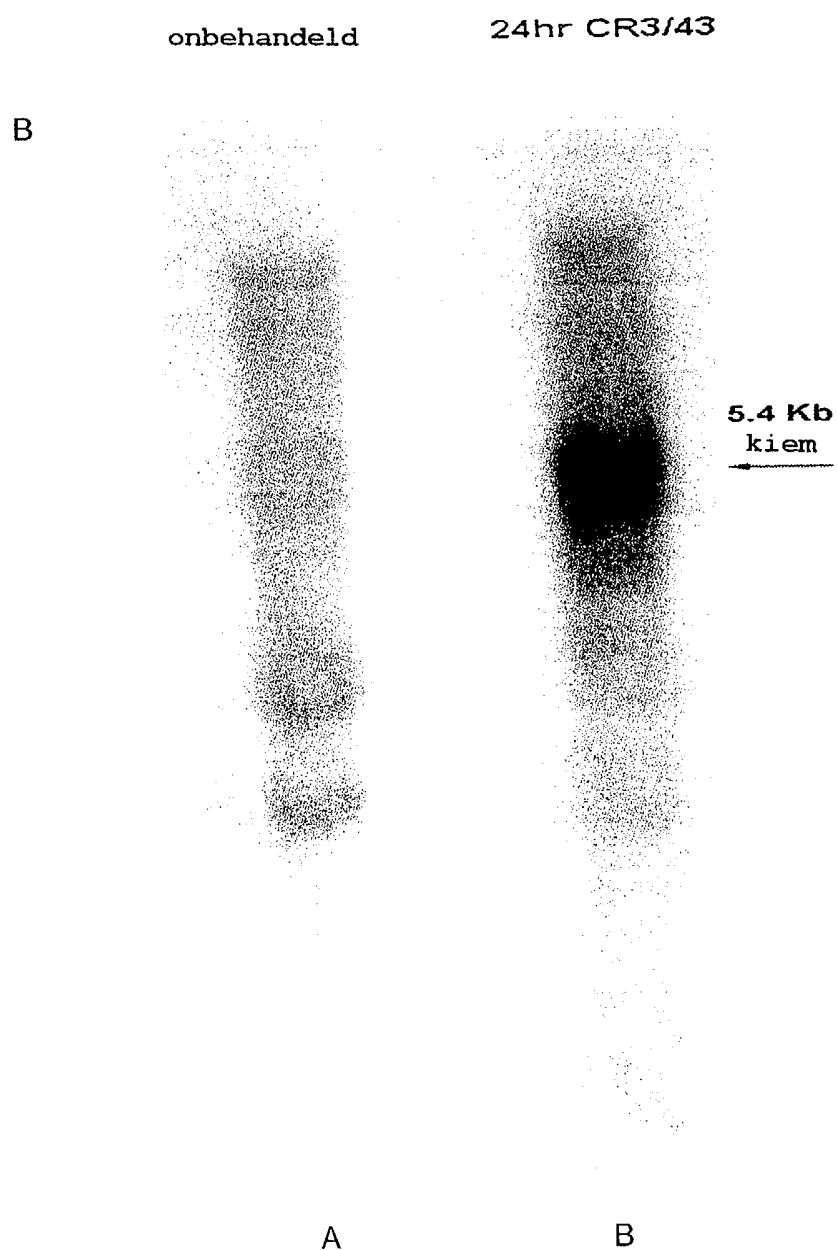


FIG. 19

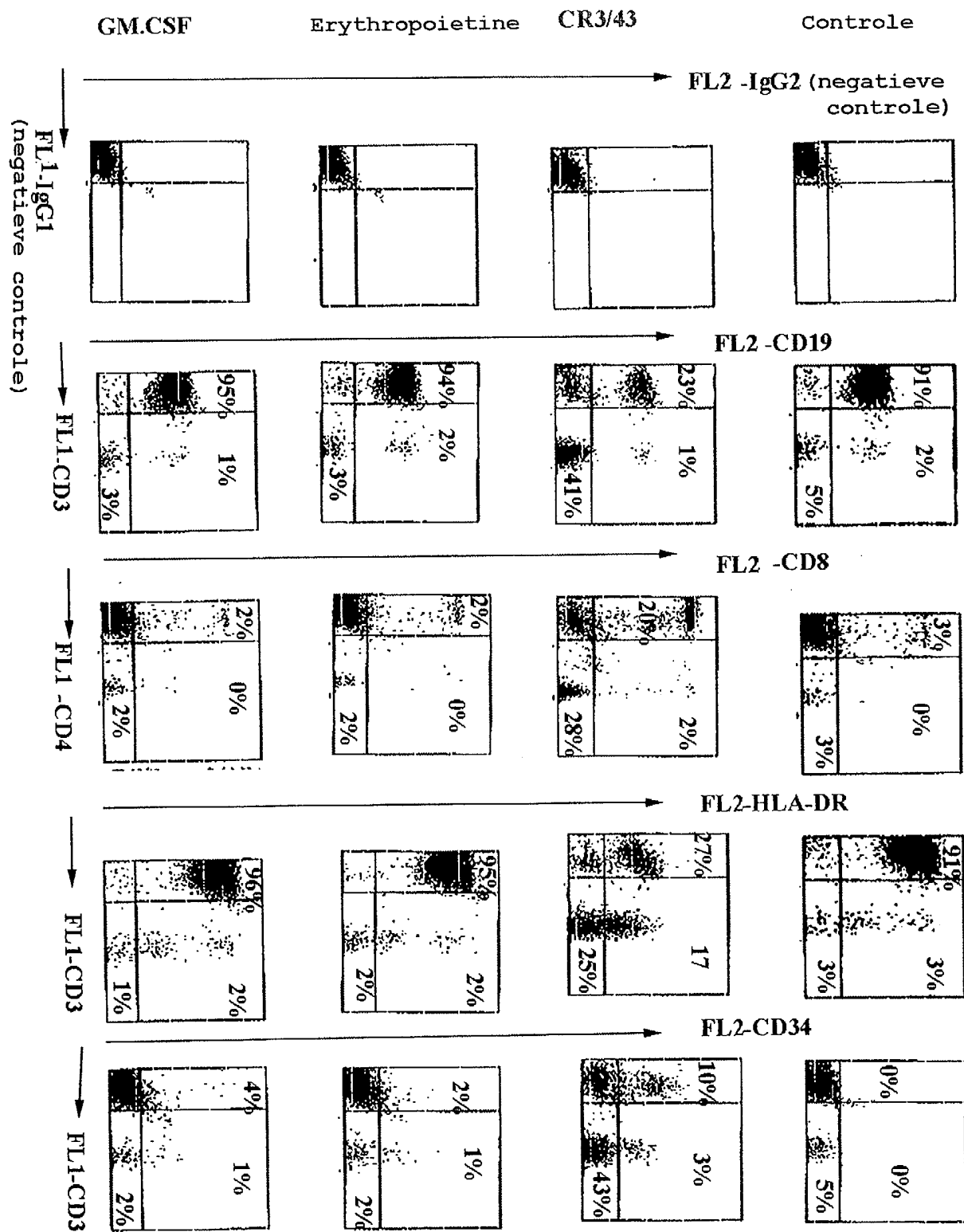
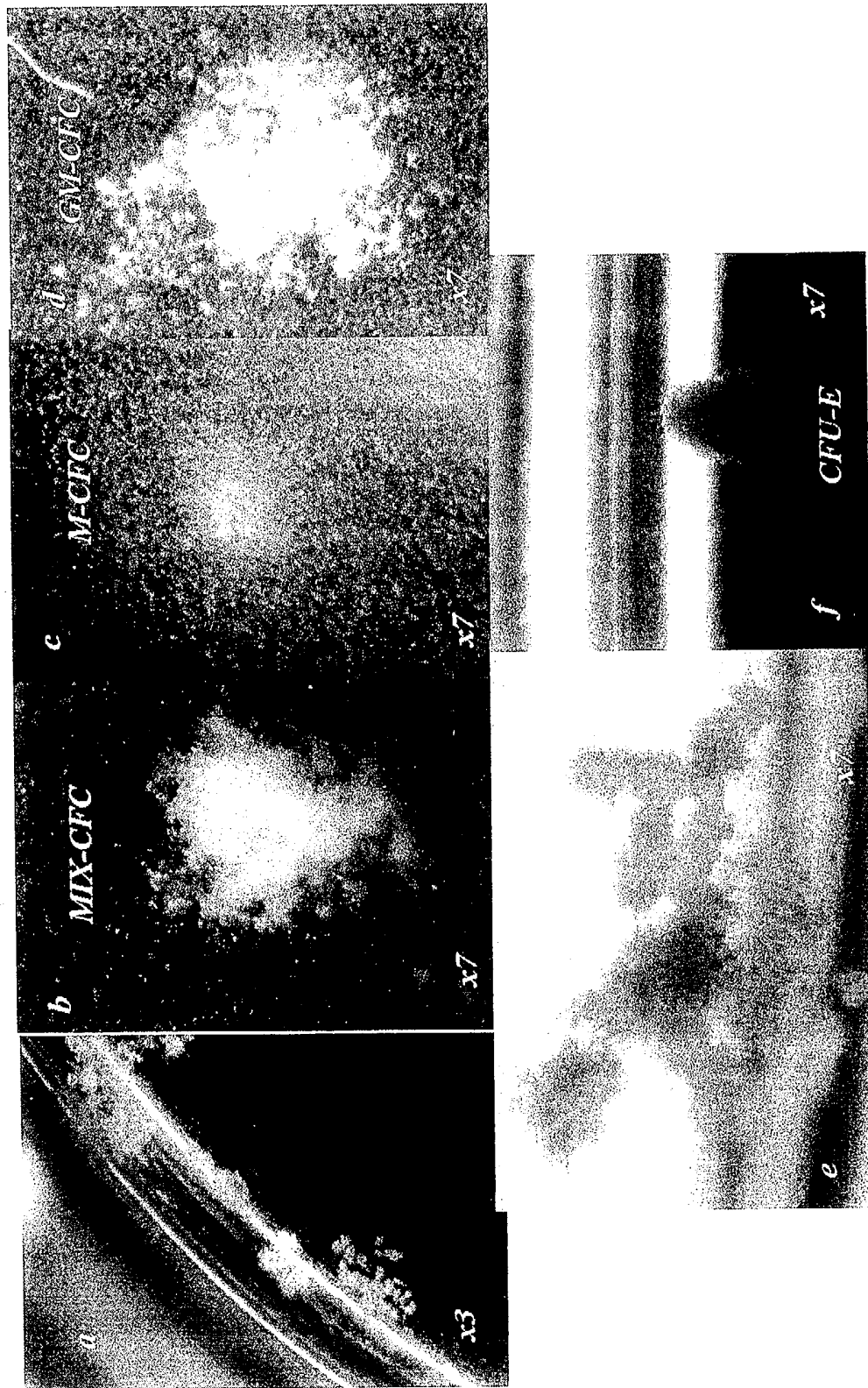


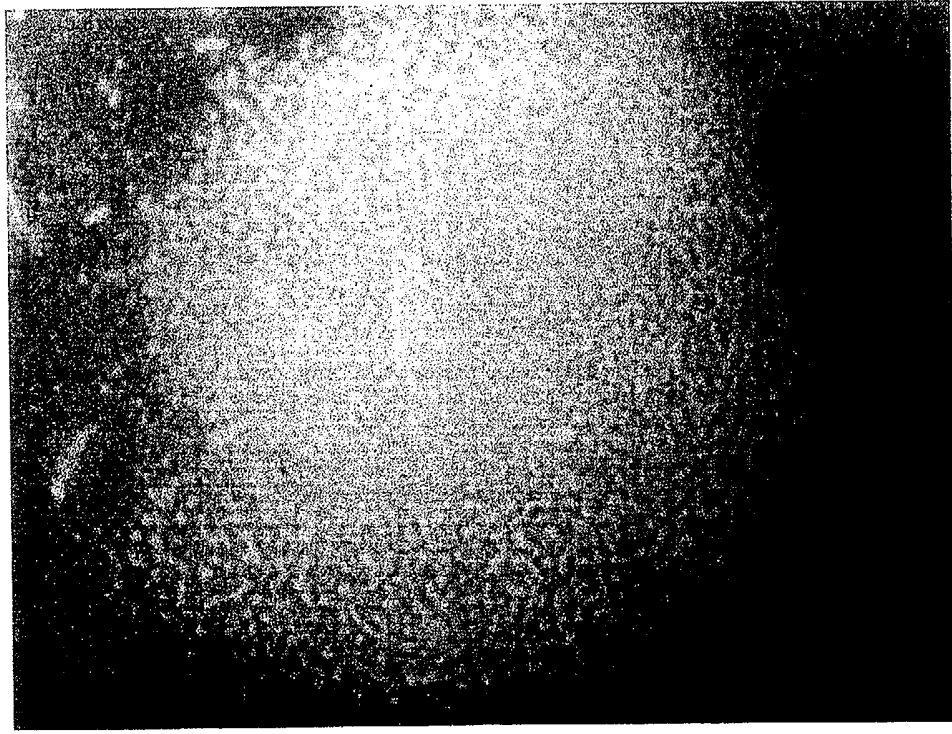
FIG. 20



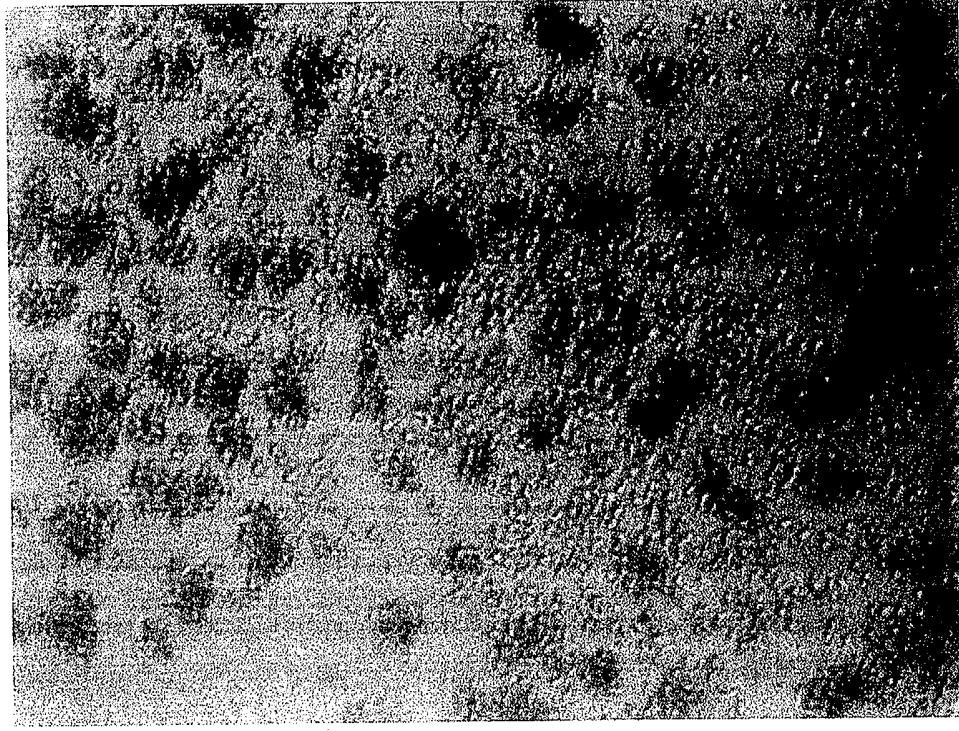
KLONALE TEST

FIG. 21

niet-hechtende cellen



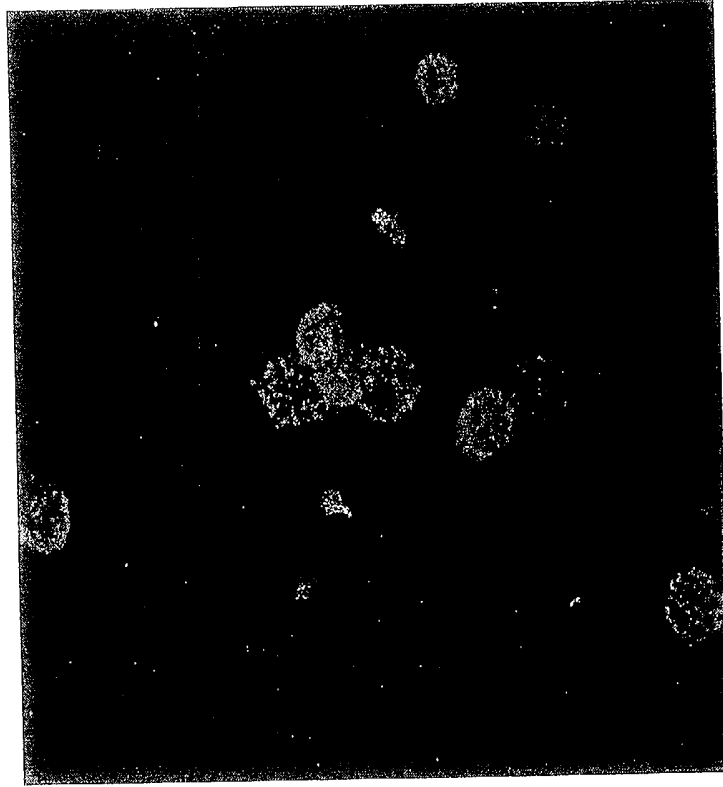
hechtende cellen



lange termijn kweek (buffy coat)

FIG. 22

B lymphocyten na behandeling
met CR3/43 mab



B lymphocyten voor behandeling
met CR3/43 mab

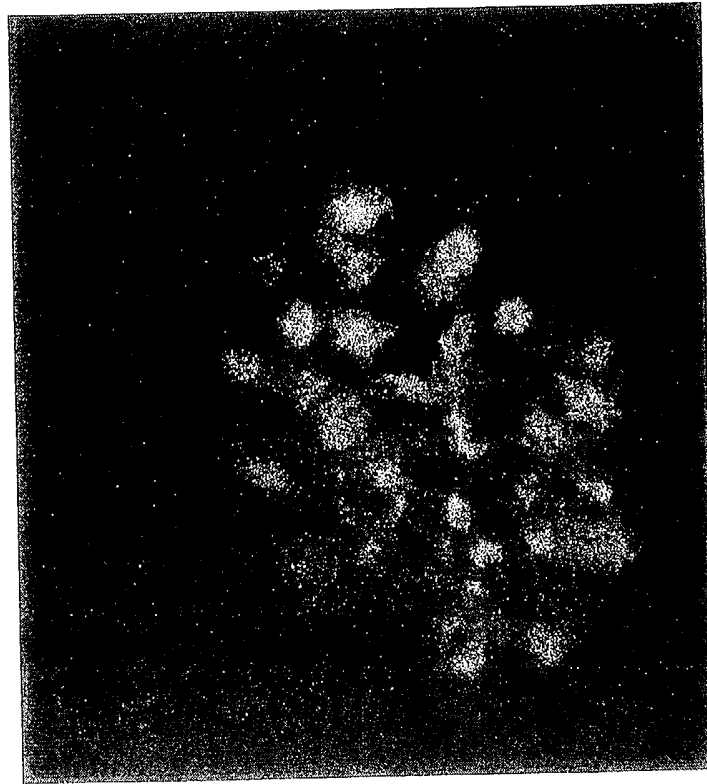


FIG. 23



RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octroolaanvraag Nr.:

NO 134963

NL 1017973

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
X	FR 2 771 421 A (BERTIN & CIE) 28 Mei 1999 (1999-05-28)	1-43	C12M3/02
Y	* conclusies; figuur 1 *	1-71, 87-94	C12N5/06 C12M1/36

P,X	FR 2 794 130 A (BERTIN TECHNOLOGIES) 1 December 2000 (2000-12-01)	1-3, 6-11, 13-43	
Y	* conclusies; figuur 1 *	1-71, 87-94	

Y	GB 2 297 558 A (ABULJADAYEL ILHAM MOHAMED SALE ;DHOOT GHAZI JASWINDER (GB)) 7 Augustus 1996 (1996-08-07) * conclusies *	1-71, 87-94	

			Onderzochte gebieden van de techniek
			C12M C12N
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek 'S-GRAVENHAGE		Datum waarop het onderzoek werd voltooid 23 Augustus 2002	Vooronderzoeker (EOB) Coucke, A
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooi-publicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octrooifamilie, corresponderende literatuur document			

EOB FORM 02.83 (P0414)

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE OCTROOIAANVRAGE NR.**

NO 134963
NL 1017973

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.
De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per
De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

23-08-2002

In het rapport genoemd octrooigescrift		Datum van publicatie		Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
FR 2771421	A	28-05-1999	FR	2771421 A1	28-05-1999
			WO	9928438 A1	10-06-1999
FR 2794130	A	01-12-2000	FR	2794130 A1	01-12-2000
			AU	4576700 A	18-12-2000
			EP	1180134 A1	20-02-2002
			WO	0073411 A1	07-12-2000
			US	2002058338 A1	16-05-2002
GB 2297558	A	07-08-1996	AP	693 A	11-11-1998
			AU	4545196 A	21-08-1996
			BR	9606866 A	23-12-1997
			CA	2211147 A1	08-08-1996
			EP	0807166 A1	19-11-1997
			WO	9623870 A1	08-08-1996
			GB	2312677 A ,B	05-11-1997
			IL	116994 A	11-01-2001
			JP	10513053 T	15-12-1998
			NZ	300650 A	29-04-1999
			RU	2177996 C2	10-01-2002
			US	2002076812 A1	20-06-2002
			US	6090625 A	18-07-2000
			US	2001024826 A1	27-09-2001
			ZA	9600727 A	16-08-1996