



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 369 695**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03816201 .2**

96 Fecha de presentación : **17.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1601687**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Métodos para incrementar la proliferación de células B.**

30 Prioridad: **26.02.2003 US 449593 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.12.2011**

73 Titular/es: **A & G Pharmaceutical, Inc.  
9130 Red Branch Road, Suite U/V  
Baltimore, Maryland 21045, US**

72 Inventor/es: **Serrero, Ginette**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 369 695 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para incrementar la proliferación de células B.

5 **Campo de la invención****Referencias**

10 Diversas publicaciones están mencionadas aquí. Citas completas para estas publicaciones son proporcionadas abajo.

**Antecedentes de la invención**

15 La proliferación y diferenciación de células en organismos multicelulares es sujeto a procesos altamente regulados. Una faceta típica de las células de cáncer es la ausencia de control sobre el proceso; la proliferación y diferenciación se vuelven desreguladas resultando en un crecimiento incontrolado. Importantes esfuerzos de investigación han sido dirigidos hacia un mejor entendimiento de esta diferencia entre células normales y de tumor. Un área de foco de investigación es los factores de crecimiento y más concretamente, la estimulación del crecimiento autocrino.

20 Los factores de crecimiento son polipéptidos que llevan mensajes a las células acerca del crecimiento, la diferenciación, la migración y la expresión de genes. Normalmente, los factores de crecimiento son producidos en una célula y actúan en otra célula para estimular la proliferación. Sin embargo, ciertas células malignas, en cultivo, demuestran una mayor o absoluta dependencia de un mecanismo de crecimiento autocrino. Las células malignas que observan este comportamiento autocrino sortean la norma de producción del factor de crecimiento por otras células y están por consiguiente desreguladas en su crecimiento.

25 El desarrollo de las células B está compuesto de dos fases: independiente de antígeno y dependiente de antígeno. La fase independiente de antígeno del desarrollo de la célula B ocurre en la médula ósea donde los progenitores de células B se distinguen en células B inmaduras presentando IgM de superficie de célula. La fase dependiente de antígeno de la diferenciación de células B ocurre en la periferia secundaria de los órganos linfoides donde las células B específicas de antígeno proliferan y se distinguen dentro de células de plasma que segregan anticuerpos específicos tras la activación.

30 Durante la fase independiente de antígeno del desarrollo de las células B, el reajuste secuencial de segmentos génicos de inmunoglobina genera un diverso repertorio de antígenos. Las células pro-B, las primeras células de línea B derivadas de progenitores de células B, están caracterizada por la aparición de proteínas de la superficie celular del linaje de primeras células B y por el reajuste de genes inmunoglobulina del locus de cadena pesada. La etapa de células es seguida por la etapa de célula pre-B la cuál está caracterizada por el reajuste de los genes de cadena ligera de inmoglobina. El reajuste exitoso de tanto las cadenas ligera y pesada lleva a la presencia de molécula IgM intactas sobre la superficie de célula en la etapa inmadura de la célula B.

35 Los células B inmaduras se someten a selección para autotolerancia en una serie de puntos de seguridad provocados por antígenos y la selección para la capacidad de sobrevivir en los tejidos linfoides periféricos. Los células B que sobreviven a la selección para autotolerancia y capacidad para sobrevivir en los tejidos linfoides periféricos se diferencian además para hacer que las células B maduras expresen IgD superficial además de IgM superficial [Burrows, 1997]. Las células B maduras recirculan a través de tejidos linfoides periféricos donde pueden encontrar antígenos. Los células B activadas por antígenos pueden distinguirse en células de plasma y segregar una enorme cantidad de anticuerpos [Duchosal, 1997]. IgM, IgD, IgG, IgA, and IgE. IgM es la primera molécula inmunoglobulina que se sintetiza y se expresa.

40 La diferenciación y desarrollo de las células B dependientes de antígeno comienzan con el enlace de antígenos en células B. La activación de células B requiere dos señales; enlace de antígenos a la inmunoglobulina de la superficie celular B e interacción de las células B con células T auxiliares específicas de antígeno. La inmoglobulina de superficie sirviendo como receptor de antígeno de la célula B (RCB, receptor de células B) tiene un papel importante en la activación de la célula B. Después de ligar el antígeno, el RCB y el complejo de antígeno es interiorizado y la proteína de antígeno se deteriora. El antígeno digerido vuelve a las superficie celular B como péptidos ligados a moléculas de clase II MHC [Parker, 1993].

45 Cuando las células B se desarrollan desde células pro-B a células de plasma, expresan proteínas superficiales de la célula distintas a la inmoglobina que son marcadores útiles para las células de linaje B en diferentes etapas del desarrollo. Una de las primeras proteínas identificables expresadas sobre la superficie de las células de linaje B es CD45R (también conocida como B220) [Osmond, 1998; Hardy, 2001]. CD45R, una proteína tirosina fosfatasa que funciona en señalación de receptor de célula B, es expresada por medio del desarrollo de la célula B a partir de células pro-B hasta células de plasma [Osmond, 1998; Hardy, 2001]. CD43 (el leucosialina de mucina) es también expresada en la etapa de la célula pro B pero su expresión se pierde a medida que las células pasan a células inmaduras B [Hardy, 2001]. CD43 es una molécula multifuncional con funcionalidad contradictoria inmediata [Ostberg, 1998]. Por ejemplo, CD43 puede actuar como una molécula de adhesión que puede guiar interacciones célula-célula de

precursores de célula B con células del estroma [Ostberg, 1998]. Sin embargo, CD43 tiene también funciones de antiadhesión [Ostberg, 1998]. CD43 tiene un importante papel en señalización de células e interacción citoesquelética [Ostberg, 1998]. CD19 es otro marcador celular de superficie expresado a partir de células pro-B a través de la etapa de la célula de plasma [Hardy, 2001]. CD19 está involucrado en la señalización del receptor de la célula B y reduce el umbral para la estimulación del receptor del antígeno de las células B [LeBien, 1998]. Otras moléculas de superficie celular expresadas durante distintas etapas del desarrollo de la célula B incluyen el antígeno estable al calor HSA, CD10, CD20, CD22, CD38, y CD40 [Duchosal, 1997; Hardy, 2001].

El desarrollo de la célula B y la diferenciación de la fase independiente del antígeno están fuertemente regulados por el linaje y los factores de crecimiento específicos de la etapa y las moléculas de adhesión celular. La interleucina 7 (IL-7), segregada por células del estroma, es un factor esencial de crecimiento para el desarrollo inicial de la célula B. IL-7 puede estimular la proliferación de células pro y pre B [Duchosal, 1997]. Neutralizar el anticuerpo anti-IL-7 puede inhibir la proliferación inducida por IL-7 de células pro y pre B [Duchosal, 1997]. La proliferación de la célula B dependiente de IL-7 es potenciada por la insulina como factor de crecimiento-1 y factor de célula madre, dos factores de crecimiento del estroma [Duchosal, 1997]. Interferones (IFNs)- $\alpha/\beta$ , segregados por macrófagos en médula ósea, pueden inhibir el crecimiento de células B inducidas por IL-7 por apoptosis [Burrows, 1997]. El factor 1 derivado de células del estroma o el factor estimulante de crecimiento de células pre B (SDF-1/PBSF), producidas constitutivamente por células del estroma de médula ósea, estimula la proliferación de células pro y pre B [Nagasawa, 1996]. Experimentos *en vivo* muestran que ratones carentes de PBSF/SDF-1 murieron perinatalmente [Nagasawa, 1996]. IL-3 estimula la proliferación de células pre B por medio de la interacción con el receptor IL-3 en células B. [Duchosal, 1997]. IL-3 es una citoquina derivada de célula T y junto con IL-6, puede estimular células madre multipotenciales y progenitores de células B [Kincade, 1989]. Neuroleucina, un homólogo de isómero de forato 6 de glucosa, tiene la capacidad de estimular el desarrollo de células B [Kincade, 1989].

Existen diversos factores de crecimiento que regulan negativamente el desarrollo de células B. IL-1 inhibe la generación de células pre B a partir de las primeras células pro B [Ryan, 1994]. Sin embargo, IL-1 incrementa la generación de células B secretoras de Ig en cultivo de médula espinal humana [Ryan, 1994]. TNF- $\alpha$  y IL-4 inhiben colonias de progenitor de linfocito humano [Ryan, 1994]. Las moléculas de adhesión de células también son importantes para el desarrollo temprano de células B. El factor de célula madre (FCM), presente en la superficie celular de células del estroma, interactúa con el receptor tirosina Kinasa de la superficie de la célula, kit, sobre el precursor de la célula B y estimula el desarrollo temprano de la célula B [Ashman, 1999]. FCM existe en ambas formas soluble o unido a membrana o como resultado de empalme y división proteolítica diferencial [Ashman, 1999]. La forma de unión de membrana de FCM contribuye a su regulación del desarrollo temprano de células B [Ashman, 1999]. Flk2/flt3 es un receptor de tirosina quinasa en la misma familia que el c-kit del receptor del factor de célula madre. El ligando flk2/flt3, que tiene homología con FCM-1, es un potente coestimulador de células B tempranas, además del IL-7 y FCM [Burrows, 1997]. La ruptura del gen flk2/flt3 conduce a una deficiencia selectiva de progenitores primitivos de células B [Burrows, 1997].

VLA-4 es una molécula de la superficie celular de precursores de célula B que interactúa con el ligando fibronectina de matriz extracelular sobre células del estroma y macrófagos, y VCAM-1 sobre células endoteliales y macrófagos [Duchosal, 1997]. VLA-4 se expresa más en células pro B que en células pre B. Por lo tanto, VLA-4 modula más efectivamente la proliferación de células B que células B [Duchosal, 1997].

La interacción entre CD44 en precursores de célula B y hialuronato en células del estroma también juega un importante papel en el desarrollo de la célula B. Los anticuerpos a CD44 inhiben el desarrollo *in vivo* de la célula B de ratón [Duchosal, 1997]. Las hormonas pueden también regular la linfopoyesis B. El estrógeno regula la generación de las células B vía un efecto sobre células del estroma en el microambiente linfopoyético [Burrows, 1997]. Ratones enanos deficientes en la expresión de prolactina y hormona estimuladora del tiroides son inmunodeficientes, debido a una deficiencia de célula T y un defecto en el desarrollo de la célula B, lo que es corregible por la falta de hormona de tiroides. [Burrows, 1997].

Las células cooperadoras T transmiten señales a las células B por medio de un contacto directo de la célula B y la célula cooperadora T. Este contacto directo es logrado por interacción independiente de antígeno de la molécula accesoria, ligandos de CD40 en la célula cooperadora T y CD40s en las células T cooperadoras de la célula B [Parker, 1993], y por interacción específica de antígeno del complejo péptido MHC de clase II sobre la superficie celular B con receptor de célula T específico de antígeno en células T cooperadoras. La activación de células B mediadas por antígeno sucede en un modo independiente T de célula o un modo dependiente de célula T. La activación de células B independiente de célula T puede suceder en respuesta a antígenos sin proteínas, tales como un polisacárido. La capacidad de las células B para responder inmediatamente a polisacáridos proporciona una rápida respuesta a muchos importantes patógenos bacterianos [Vos, 2000]. La activación de células B dependientes de células T tiene lugar en respuesta a antígenos de proteínas o a antígenos sin proteínas conjugados con moléculas portadoras de proteínas.

La activación de células B dependiente de células T es el núcleo de inmunidad humoral. Las células T cooperadoras activadas producen citoquinas solubles que pueden estimular la proliferación de células B y la diferenciación [marcador, 1993]. La primera citoquina soluble identificada fue IL-4, también conocida como factor 1 estimulador de célula B (BFE-1) o factor de crecimiento de célula B (FCCB). IL-4 fue identificada originalmente como una molécula capaz de estimular la síntesis de ADN de células B de ratón estimuladas por anti-IgM [Howard, 1982]. El IL-4 humano es una glucoproteína aminoácida 153 que tiene un núcleo de proteína con una masa molecular de 15 KD. IL-4 humano

## ES 2 369 695 T3

glucosilado puede tener una masa molecular de 20KD [Yokota, 1986; Ohara, 1987]. IL-4 tiene múltiples efectos sobre las células B. Por ejemplo, el IL-4 puede aumentar la proliferación de células B estimulada con anticuerpos anti-IgM [Howard, 1982], inducir la expresión de MHC clase II y CD23 [Conrad, 1987; Jansen, 1990], y regular la expresión de isotipos de inmoglobulina. Por ejemplo, el IL-4 es capaz de inducir a las células B a que produzcan IgE [Pene, 1988] e inducir el cambio de expresión de células de producir IgM a IgG1 y/o IgE [Callard, 1991]. IL-4 también juega un papel en la regulación de las células T, mastocitos, monocitos, hematopoyesis, fibroblastos [Jansen, 1990].

La Interleucina (IL-2) es una glucoproteína aminoácida 133 con un peso de molécula de 13 a 17.5 KD de acuerdo a glucosilación viable [Robb, 1981]. IL-2, producida por células T, estimula la proliferación de células B activadas [Gearing, 1985], promueve la inducción de secreción de inmoglobulina y la síntesis de cadena J por células B [Gearing, 1985; Blackman, 1986], y actúa para aumentar los efectos inmunes mediados por células B activadas [Mingari, 1984].

La interleucina 6 (IL-6) es una glucoproteína de 186 aminoácidos con un peso molecular de 19 a 30 KD [May, 1989] que es producido a partir de muchos tipos de células incluyendo monocitos, macrófagos, células del estroma, y células de plasma [May, 1988; Frassanito, 2001]. IL-6 está bien establecida como un factor de diferenciación de última etapa para la transición de célula B a célula de plasma [Muraguchi, 1988]. IL-6 estimula células B activadas para producir IgM, IgG, y IgA [Muraguchi, 1988]. IL-6 también aumenta la respuesta de anticuerpo específico de antígeno para antígeno *in vitro* y *in vivo* [Takatsuki, 1988]. Mientras la fase dependiente de antígeno del desarrollo de célula T depende de la producción de un factor autocrino, IL-2, un correspondiente factor regulatorio autocrino para células B no se ha identificado todavía.

PCDGF (factor de crecimiento derivado de célula PC) es un factor de crecimiento autocrino altamente tumorigénico y agente causante de una amplia variedad de tumores. Por ejemplo, los niveles de PCDGF son elevados en células hematopoyéticas tumorigénicas tales como leucemias de célula B, pero no pueden ser detectados en células normales B. Como se describe en la Patente U.S. 6,309,826, la sobreexpresión de PCDGF conduce al crecimiento incontrolado de células de tumor y tumorigénesis incrementada. El grado de sobreexpresión PCDGF se correlaciona directamente con el grado de tumorigenicidad celular. El PCDGF sobreexpresante de células no necesita señales externas para mantener el crecimiento incontrolado de células. La pérdida de crecimiento regulado de células, tal como una pérdida de respuesta a la insulina y/o estrógeno, conduce a malignidad incrementada y crecimiento excesivo no regulado de células. Sin embargo, no ha sido previamente mostrado que PCDGF esté asociado con estimular el crecimiento de células B no tumorigénicas (ejemplo, normal).

Mientras que PCDGF aumenta moderadamente el crecimiento de células 3T3, PCDGF inhibe el crecimiento de otras varias líneas celulares. Por ejemplo, PCDGF inhibe el crecimiento de células epiteliales normales de pulmón de visión (CCL 64). Xia, X y Serrero, G, Identification of cell surface binding sites for PC cell derived growth factor, (epithelin/granulin precursor) on epithelial cells and fibroblasts, Biochem. Biophys. Res. Commun. 245, 539-543, 1998. PCDGF también inhibe el crecimiento de células epiteliales tímica de rata y ratón normales (células BT1B y TEASA3A1) (Serrero, resultados sin publicar).

El PCDGF no tiene efecto en la proliferación de varias líneas de células incluyendo células Hela y CHO (Serrero, datos sin publicar), y células Cos-7 (Plowman, et al, 1993; Serrero unpublished results; Plowman, G. D., Green, J. M., Neubauer, M. G., Buckley, S. D., McDonald, V. L., Todaro, G. J., and Shoyab, M. (1992). The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities).

### Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos *ex vivo* para incrementar la proliferación de células B *ex vivo* no tumorigénicas administrando PCDGF a células B. Hemos descubierto que el PCDGF es un factor de crecimiento autocrino para células B normales (por ejemplo, no-tumorigénicas). De ahí, PCDGF puede ser usado para aumentar la proliferación de células normales por ejemplo, para mejorar la eficiencia de cultivo de células hematopoyéticas primarias. La eficiencia mejorada y el crecimiento del cultivo de células B primarias es de gran valor en, por ejemplo, estableciendo y mantenimiento de líneas de células (por ejemplo, líneas de células madre) para uso en investigación biomédica.

La invención proporciona, en una realización, un método *ex vivo* de incrementar la proliferación de células B *ex vivo* no tumorigénicas administrando una cantidad efectiva de PCDGF a células B en donde la proliferación de las células B es aumentada en, preferentemente al menos dos veces. Otra realización de la invención proporciona un método *ex vivo* de aumentar la proliferación de células B *ex vivo* no tumorigénicas administrando una cantidad efectiva de PCDGF a células B en donde la proliferación de las células B es aumentada en al menos 3 veces. Otras realizaciones de la invención proporcionan métodos para estimular síntesis de ADN en células B no tumorigénicas comprendiendo administrar PCDCF a células B en donde la síntesis de ADN es aumentada al menos dos veces.

Realizaciones adicionales y ventajas de la presente invención serán establecidas en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias desde la descripción, o pueden ser aprendidas por la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se lograrán por medios de los instrumentos y combinaciones señaladas particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra que niveles de mRNA de PCDGF en células B de ratón normal son enormemente incrementados tras la activación de las células desde el estado de reposo al estado activado por la adición de LPS. El mRNA de PCDGF aumentó tan pronto como 6 horas después de la adición de LPS (lipopolisacárido) como se muestra por análisis Northern blot.

Las Figs. 2A y 2B muestra que la expresión de proteína PCDGF es también radicalmente incrementada 48 horas después de la adición de LPS como es mostrado por tñido inmunofluorescente que detecta la presencia de PCDGF. La Fig. 2A muestra tñido de PCDGF en ausencia de LPS mientras que la Fig. 2B muestra tñido de PCDGF 48 horas después de la adición de 10 ug/ml de LPS.

La Fig. 3 muestra que la proliferación de células, como es indicada por la incorporación de timidina, aumenta al menos 100 veces después de 48 horas de incubación con 10 ug/ml de LPS.

La Fig. 4 muestra que la expresión aumentada de PCDGF fue debida a la adición de LPS. El ensayo de reacción en cadena de polimerasa transcritptasa-inversa (RT-PCR) muestra que se detectó mRNA de PCDGF en muestras estimuladas por LPS y no detectadas en el control o muestras estimuladas por Con A.

La Fig. 5 muestra que la expresión incrementada de proteína PCDGF fue debida a la adición de LPS ya que las proteínas PCDGF fue únicamente detectada en la muestra estimulada por LPS.

La Fig. 6 muestra que la proliferación de linfocitos de bazo de ratón se activa tanto por LPS como por Con A.

Las Figs. 7A-D muestran que las células positivas de PCDGF proliferan por la estimulación de LPS. Linfocitos de ratón estimulados con LPS fueron inmunotñidos usando anti PCDGF y anti-BrdU (anticuerpo análogo de timidina). Las células que se tñieron positivas para PCDGF también se tñieron positivas para anti-BrdU y anti-B220 mostrando que las células PCDGF positivas estimuladas con LPS estaban proliferando (es decir, incorporando timidina). Se incubaron linfocitos de bazo de ratón sin LPS (7A y B) o con 10 ug/ml LPS (7C y D) y se tñieron con anticuerpo B220-BrdU (7A y C) o anticuerpo anti-PCDGF (7B y D).

Figs. 8A-F muestran que las células positivas de PCDGF son linfocitos B. Los linfocitos de ratón se tñieron con un anticuerpo anti-B220-FITC que está dirigido al antígeno B220, un marcador común de células B. Las células que se tñieron positivas para PCDGF también se tñieron positivas para B220. Los linfocitos de bazo de ratón fueron incubados sin LPS (8A-C) o con 10 ug/ml LPS (8D-F) y manchados con anticuerpos B220-FITC (8A y D), DAPI (8B y E) o anticuerpos anti-PCDGF (8C y F).

La Fig. 9 muestra que PCDGF estimula la proliferación de células de bazo de ratón. 200 ng/ml de PCDGF, 10 ug/ml de anti-IgM, y la combinación de PCDGF y de anti-IgM estimuló la proliferación de células B en estado de reposo de ratón en 2.7, 3.7, y 4.6 veces respectivamente después de un tratamiento de 72 horas.

**Descripción detallada de la invención**

PCDGF es un potente factor de crecimiento de células cancerígenas y el agente tumorigenico para una amplia variedad de tumores en pecho, ovario, pulmón, riñón, hígado, hemopoyético y otros tejidos. Dado el papel destacado de PCDGF en tumorigénesis, la investigación de PCDGF ha sido siempre dirigida hasta ahora a inhibir y/o inactivar el PCDGF a fin de inhibir o interferir con el crecimiento de la célula del tumor. Los antagonistas de PCDGF, tales como los anticuerpos anti-PCDGF, interfieren con la actividad biológica del PCDGF (ejemplo, la actividad tumorigénica) ligando directamente el PCDGF y evitando que el PCDGF transmita señales de crecimiento de células a una célula objetivo (ejemplo, la célula de cáncer de pecho). El PCDGF no ha sido usado previamente para aumentar la proliferación celular en células B no tumorigénicas.

El inventor ha hallado sorprendentemente que el PCDGF puede ser usado para aumentar la proliferación de células B no tumorigénicas. El término "células B no-tumorigénicas" se refiere a células B que no exhiben el crecimiento, regulación, y/o actividad biológica de crecimiento de célula tumorigénica (ejemplo, crecimiento desregulado, capacidad de provocar tumores después de la inyección dentro de un animal). El término "células B" se refiere a células B de cualquier etapa de desarrollo (ejemplo, las células madre B, las células progenitoras B, las células B diferenciadas, las células de plasma) y de cualquier fuente incluyendo, pero no limitado a sangre periférica, ganglios linfáticos, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o células de bazo.

A pesar de que el PCDGF no es detectado en células B en estado de reposo normal (ejemplo, células estables no sometidas a divisiones celulares o proliferación), el mRNA y niveles de proteína de PCDGF son elevadas de forma importante cuando las células B son cambiadas de un estado de reposo a uno activo. El LPS (lipopolisacárido) es un compuesto complejo hallado en la pared de la célula de bacterias gram-negativas. El LPS es un conocido mitógeno para células B. Cuando los linfocitos de bazo de ratón son activados con 10 ug/ml de LPS, la expresión de mRNA PCDGF aumentó tan pronto como seis horas tras el tratamiento como se muestra por análisis Northern-blot (Fig. 1). El mRNA PCDGF es virtualmente indetectable en células normales antes de la adición de LPS (ver columnas 1-5 de la Fig. 1). De seis a cuarenta y ocho horas después del tratamiento con LPS, la expresión de mRNA PCDGF creció espectacularmente (ver columnas de 6-9 de la Fig. 1).

## ES 2 369 695 T3

La activación de células B normales con LPS también resulta en expresión de proteína PCDGF incrementada. El teñido inmunofluorescente de linfocitos esplénicos de ratón con anticuerpo PCDGF antihumano de conejo purificado 48 horas después de la adición de 10 ug/ml LPS (Fig. 2B) o el control (Fig. 2A) muestra el incremento espectacular en niveles de proteína PCDGF siguiendo tratamiento con LPS. Niveles incrementados de mRNA PCDGF y proteína se correlacionan con el incremento de proliferación de células (Fig. 3). La incorporación de timidina por linfocitos esplénicos de ratón fue estimulada al menos 100 veces después de 48 horas de incubación con 10 ug/ml de LPS.

Linfocitos esplénicos de ratón son una mezcla de células B y T. Con el fin de determinar si la estimulación de LPS de linfocitos esplénicos de ratón es específica de células B, Con A, un activador de linfocito T, fue usado para activar linfocitos esplénicos de ratón. Como se muestra en la Fig. 4, mRNA PCDGF fue únicamente detectado en muestras estimuladas de LPS pero no en el control o muestras estimuladas de Con A como se indica en un experimento de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RCPTI). El mRNA PCDGF transcrito se muestra en el LPS+, columnas Con A- pero no en el LPS-, columnas Con A + entre 6 y 48 horas después de la adición de o bien LPS o Con A. Asimismo, los niveles de proteína PCDGF son estimulados por LPS pero no por Con A como se muestra por inmunoprecipitación seguida por análisis Western-blot con anticuerpos anti-PCDGF tras 24 horas de estimulación de linfocitos esplénicos de ratón con o bien 10 ug/ml LPS (Fig. 5, calle 2) o 2.5 ug/ml Con A (Fig. 5, calle 3). La proliferación de linfocitos esplénicos de ratón es estimulada por o bien 10 ug/ml LPS o 2.5 ug/ml Con A (Fig. 6). De este modo, niveles incrementados de mRNA y proteína PCDGF en linfocitos activados esplénicos de ratón resultan de la activación de células B.

Con el fin de determinar si los linfocitos esplénicos de ratón positivos por PCDGF están proliferando células B por la estimulación de LPS, fue llevado a cabo teñido inmunofluorescente usando anticuerpos dirigidos a PCDGF, análogo de timidina, y marcadores de células B. BrdU es un análogo de timidina incorporado dentro del ADN durante la síntesis de ADN (un indicador de proliferación de la célula). B220 es un antígeno, usado comúnmente como marcador de célula B, que es expresado en linfocitos B en todas las etapas desde pro-B a células B maduras. Linfocitos esplénicos de ratón fueron incubados sin (Figs. 7A y 7B) o con (Figs. 7C y 7D) 10 ug/ml LPS y teñidos con anticuerpos anti-BrdU (Figs. 7A y 7C) o anticuerpos anti-PCDGF (Figs. 7B y 7D). Como se muestra en las Figs. 7C y 7D, las células PCDGF y LPS positivas eran también BrdU positivas mientras las células negativas LPS eran o bien PCDGF o BrdU positivas. Así, las células positivas PCDGF eran células B proliferantes mientras que células negativas PCDGF (ejemplo, células desestimuladas) no estaban proliferando. Los linfocitos esplénicos de ratón proliferantes eran células B como se muestra en las Figs. 8A-8F. Los linfocitos esplénicos de ratón estaban desestimulados (8A-C) o estimulados (8D-F) con 10 ug/ml de LPS. Las células fueron teñidas con anticuerpo anti-8220 (8A y 8D), DAPI (4,6-diamidino-2-phe-nilindola) mancha nuclear (8B y 8E), o anticuerpos anti-PCDGF (8C o 8F). Las células estimuladas eran positivas para el teñido de células B (anti-B220) y el teñido de PCDGF (anti-PCDGP) como se muestra en las Figuras 8D y 8F. DAPI tiñe el núcleo de las células y por tanto muestra la población de células entera.

PCDGF puede inducir a proliferar las células B en estado de reposo. Como se muestra en la Fig. 9, linfocitos esplénicos de ratón en estado de reposo fueron tratados con un control (calle 1), 200 ng/ml PCDGF (calle 2), 10 ug/ml IgM (calle 3), o tanto 200 ng/ml de PCDGF y 10 ug/ml de IgM (calle 4). La proliferación de células B fue estimulada después de 72 horas de tratamiento por 0, 2.7, 3.7, y 4.6 veces respectivamente en columnas 1-4. PCDGF solo (Fig. 9, calle 3) o en combinación con IgM (Fig. 9, calle 4) puede inducir a células B en estado de reposo a proliferar.

Una realización del invento proporciona métodos *ex vivo* de incrementar la proliferación de células B *ex vivo* no tumorigénicas comprendiendo administrar una cantidad efectiva de PCDGF a dichas células donde la proliferación de dichas células es incrementada por al menos 2 veces. PCDGF puede también ser coadministrada con otro factor de proliferación de células B incluyendo, pero no limitado a, IgM. La coadministración de PCDGF y otro mitógeno de célula B (ejemplo, IgM, LPS) pueden además incrementar la proliferación de células B como se muestra en la Fig. 9. PCDGF y un estimulador de células co-B puede ser administrado simultáneamente o secuencialmente a células B o incorporado directamente dentro de los medios de línea celular B.

Otra realización proporciona métodos *ex vivo* de incrementar la síntesis de ADN en células B *ex vivo* no tumorigénicas comprendiendo administrar una cantidad efectiva de PCDGF a dichas células en donde la síntesis de DNA en dichas células es incrementada por, preferentemente al menos 2 veces. Una realización adicional de la invención proporciona métodos *ex vivo* de incrementar síntesis de ADN en células B *ex vivo* no tumorigénicas comprendiendo administrar una cantidad efectiva de PCDGF y otro factor estimulador de síntesis de ADN de células B (ejemplo, IgM) a dichas células en donde la síntesis de ADN en dichas células es incrementada por, por ejemplo, al menos 2 o 3 veces.

PCDGF puede estar proporcionado a las células añadiendo PCDGF en un portador apropiado (ejemplo, buffer) al medio de cultivo de célula en concentraciones típicamente yendo desde el 0.01 ng a alrededor de 100 mg/ml y preferentemente desde alrededor de 10 ng a alrededor de 50 mg/ml. Las células B pueden también ser transfectadas con ADN o RNA codificando PCDGF o fragmentos de PCDGF activos los cuales retienen la capacidad de incrementar la proliferación de células B no tumorigénicas o vectores conteniendo tales como secuencias ADN o RNA. Células B transferidas puede ser inducidas a crear PCDGF o fragmentos PCDGF activos usando la técnica adecuada (ejemplo, el promotor inducible, y copias plásmidas múltiples). En otra realización de la invención, las células B pueden estar colocadas con células produciendo PCDGF (ejemplo, células tumorigénicas incluyendo, pero no limitado a células múltiples de mieloma, células transfectadas con PCDGF codificando ácido nucleico). PCDGF segregado de células productoras de PCDGF puede provocar proliferación de células B normales en proximidad de las células productoras de PCDGF.

## ES 2 369 695 T3

También se han revelado métodos *ex vivo* de células B proliferantes identificables en una población de células homeopáticas comprendiendo, medir el nivel de PCDGF en dichas células en donde las células PCDGF son células B proliferantes. Como se muestra en la Fig. 8, las células positivas PCDGF en una población de linfocitos esplénicos de ratón (incluyendo ambas células B y células T) también tiñe positivo para células B proliferantes. De este modo, el teñido positivo para PCDGF es indicativo de la presencia de células B proliferantes en una población de células homeopáticas. Las células B proliferantes pueden ser aisladas de una población de células mezclada y usada para establecer líneas celulares, formar hibridomas con células de mieloma, o establecer el cariotipo.

Las células B, y otras células hematopoyéticas, son generalmente conocidas por ser difíciles de mantener en cultivo celular. PCDGF puede ser usado para establecer cultivo *in vitro* de células B mamíferas de cualquier origen (ejemplo, células madre, médula ósea, sangre del cordón umbilical, células madre embrionarias). Otra realización de la invención proporciona métodos *ex vivo* de incrementar la proliferación de células *ex vivo* no tumorigénicas que responden a PCDGF (ejemplo, células B mamíferas, células madre B mamíferas, células de médula ósea mamífera y células que responden a PCDGF de sistemas hematopoyéticos). Por ejemplo, PCDGF puede ser usado para estimular la formación de células hibridomas las cuales están formadas de células de bazo y células de mieloma múltiples fusionadas.

En realizaciones adicionales de la invención, PCDGF puede ser usado para establecer y mantener líneas celulares B inmortalizadas, expandir poblaciones de células B para establecimiento del cariotipo, y para estimular la producción de antígeno de células en estado de reposo. Las células B de cualquier etapa del desarrollo de células B o cualquier origen pueden ser activadas usando PCDGF y/o un estimulador de células co-B, identificado usando anticuerpos anti-PCDGF, y establecido en unas líneas celulares *in vitro*. Líneas celulares B pueden ser inmortalizadas y/o mantenidas en un estado activo y proliferante por la adición de PCDGF a los medios de cultivos de células. PCDGF puede también ser usado para activar células B activas en estado de reposo resultando en la producción de anticuerpos. Por ejemplo, PCDGF puede ser usado para estimular la formación de células hibridoma las cuales están formadas de células de bazo y células demieloma múltiple fusionadas.

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o ambiente específico será dentro de la capacidad de tener una habilidad normal en la técnica a la luz de las enseñanzas aquí contenidas. La presente invención está más ilustrada plenamente por los siguientes ejemplos no limitadores.

### Ejemplo 1

#### *Expresión de PCDGF estimulado por LPS*

Investigamos la expresión de PCDGF por activación por LPS, un mitógeno para células B normales de ratón. Cuando linfocitos de bazo de ratón fueron activados por 10 Pg/ml de LPS, la expresión de mRNA PCDGF aumentó espectacularmente tan pronto como en 6 horas como es mostrado por análisis de Northern-blot (Figura 1). Linfocitos de bazo de ratón fueron cultivados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS. 10 Pg/ml de LPS fueron usados para activar células B de ratón en estado de reposo. RNAs fueron aislados en 0, 6, 12, 24, y 48 horas. Análisis de Northern blot fueron llevados a cabo para revisar la expresión de mRNA PCDGF. El panel superior muestra la expresión de mRNA PCDGF. El panel inferior muestra de teñido de 18S y 28S RNA EB para indicar carga igual para cada calle.

La expresión de proteína de PCDGF fue también espectacularmente incrementada tras 48 horas como se muestra por el teñido inmunofluorescente (Figura 2). Linfocitos de bazo de ratón fueron incubados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS durante 48 horas sin (A) o con (B) 10 Pg/ml de LPS. La preparación de citospina de células fue fijada con 2% de paraformaldehído en PBS, permeabilizado con 0.2% de Triton X 100 en PBS, y teñido con anticuerpo de PCDGF antihumano de conejo purificado y desarrollado con IgG F(ab')<sub>2</sub> conjugado de de cabra anticonejo Alexia 488. El teñido inmunofluorescente fue observado y fotografiado usando un microscopio fluorescente Olympus BX40 equipado con lámpara de mercurio de 100 W.

La incorporación de timidina alcanzó una estimulación de 100 veces y cpm máxima después de 48 horas de incubación con 10  $\mu$ g/ml de LPS (Figura 3). Linfocitos de bazo de ratón fueron cultivados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml con o sin LPS (10  $\mu$ g/ml) en un volumen final de medio 0.2 ml de RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS en unas placas de 96 pocillos de base plana. [3H] TdR (1  $\mu$ Ci/pocillo) fue añadida al cultivo durante las últimas 6 horas. La incorporación de timidina fue revisada en 24, 48, y 72 horas. El resultado está expresado como media  $\pm$  SD. Esos datos indicaron que tras la activación de células B normales, las expresiones de mRNA PCDGF y proteína fueron estimuladas espectacularmente.

### Ejemplo 2

#### *Incremento de expresión de PCDGF fue específico de la activación de célula B*

Linfocitos de bazo de ratón, las células que usamos en nuestros experimentos, son una mezcla de células T y B de ratón. Con el fin de controlar si el incremento de expresión de PCDGF es específico a la activación de células B, usamos Con A, un activador fuerte de linfocito T, para estimular células T de linfocitos de bazo de ratón y medir la

## ES 2 369 695 T3

expresión de PCDGF. Como se indica por RT-PCR (Figura 4), mRNA PCDGF fue únicamente detectada en muestras estimuladas por LPS pero no en control y muestras estimuladas por Con A de 6 a 48 horas. Linfocitos de bazo de ratón fueron incubados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de ConA, o vehículo. RNAs fueron aisladas a 0, 6, 12, 24, y 48 horas y RT-PCR fue llevado a cabo para revisar la expresión de mRNA PCDGF (panel superior). El ratón  $\beta$ -actin fue usado como un control interno para indicar la carga igual de cada calle (panel inferior).

La expresión de la proteína PCDGF fue también únicamente detectada en muestra estimulada por LPS (Figura 5). Linfocitos de bazo de ratón fueron incubados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 conteniendo 10% FBS con 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  ConA, o vehículo durante 24 horas. Los medios de cultivo conteniendo la misma cantidad de células vivas ( $6 \times 10^6$  células vivas) fueron usados para inmunoprecipitación seguida por análisis de Western blot para comprobar la expresión de proteína de PCDGF.

Los datos de incorporación de timidina muestran que los linfocitos de bazo de ratón fueron activados por o bien LPS o Con A (Figura 6). Los linfocitos de bazo de ratón fueron cultivados en  $1.2 \times 10^6$  células/ml con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de ConA, o vehículo durante 48 horas en un volumen final de medio 0.2 ml de RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS en unas placas de 96 pocillos de base plana. [3H] TdR (1  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ) fue añadido al cultivo durante las últimas 6 horas. Los resultados están expresados como media  $\pm$  SD. Esos datos mostraron que el incremento de expresión de PCDGF era específico a la activación de células B.

### Ejemplo 3

#### *Células positivas PCDGF durante estimulación de LPS son células B proliferantes*

Con el fin de probar que las células positivas PCDGF son células B proliferando por encima de estimulación LPS, teñido inmunofluorescente fue llevado a cabo usando anticuerpos anti-PCDGF, anticuerpos anti-BrdU, y anticuerpos anti-B220. BrdU es un análogo de timidina y es incorporado específicamente dentro de ADN durante la síntesis de ADN. Teñido de los linfocitos de ratón con anticuerpo fluoresceína de BrdU mostró que los linfocitos teñidos positivo para PCDGF fueron positivos para BrdU indicando que las células que expresaron PCDGF eran células proliferantes (Figura 7). El antígeno B220 es expresado en linfocitos B en todas las etapas desde pro-B a través de células B maduras. B220 es comúnmente usado como un marcador de célula B. Teñido de los linfocitos de ratón con anticuerpos B220-FITC mostró que los linfocitos teñidos positivo para PCDGF eran positivos para B220 indicando que las células que expresaron PCDGF era células B (Figura 8). Linfocitos de bazo de ratón fueron incubados a  $1.2 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 conteniendo 10% de FBS durante 48 horas sin (A, B, C) o con (D, E, F) 10 Pg/ml de LPS. Células fueron fijadas con 2% de paraformaldehído en PBS, permeabilizado con 0.2% de Triton X 100 en PBS, y teñido con B220-FITC (A y D), Dapi (B y E), o anticuerpo PCDGF antihumano de conejo purificado seguido por el anticuerpo secundario IgG de anticonejo de cabra con Texas rojo Texas red (C y F). Teñido inmunofluorescente fue observado y fotografiado usando un microscopio por fluorescencia Olympus BX40 equipado con una lámpara de mercurio 100 W.

### Ejemplo 4

#### *PCDGF estimula proliferación celular de bazo de ratón*

Es importante investigar si PCDGF sólo o con otros mitógenos de células B puede estimular la proliferación de células B en reposo. Usamos la incorporación de timidina para determinar el efecto de PCDGF, anti IgM, o PCDGF sobre la proliferación de células B en reposo de ratón. Como se muestra en la Fig. 9, 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-IgM, 200 ng/ml con 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-IgM, estimuló la proliferación de células B en reposo de ratón en 2.7, 3.7, y 4.6 veces, después de un tratamiento de 71 horas. Los linfocitos de bazo de ratón se incubaron en  $5 \times 10^6$  células/ml durante 72 horas con 200 ng/ml PCDGF, 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-IgM, o ambos en un volumen final de medio 2 ml RPMI 1640 conteniendo 10% FBS in placas de 96 pocillos de fondo plano. [3H] TdR (1 PCi/ pocillo) se añadió al cultivo durante las últimas 16 horas. El resultado se expresa como media  $\pm$  SD.

### Referencias

1. Ashman, L. K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 1037-1051.
2. Blackman, M. A., Tigges, M. A., Minie, M. E., and Koshland, M. E. (1986). A model system for peptide hormone action in differentiation: interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell* 47, 609-617.
3. Burrows, P. D., and Cooper, M. D. (1997). B cell development and differentiation. *Current Opinion in Immunology* 9, 239-244.

## ES 2 369 695 T3

4. **Callard, R. E.** (1991). Immunoregulation by interleukin-4 in man. *British Journal of Haematology* 78, 293-299.
5. **Conrad, D. H., Waldschmidt, T. J., Lee, W. T., Rao, M., Keegan, A. D., Noelle, R. J., Lynch, R. G., and Kehry, M. R.** (1987). Effect of B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) on Fc epsilon and Fc gamma receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *Journal of Immunology* 139, 2290-2296.
6. **Cornall, R. J., Goodnow, C. C., and Cyster, J. G.** (1995). The regulation of self-reactive B cells. *Current Opinion in Immunology* 7, 804-811.
- 10 7. **Duchosal, M. A.** (1997). B-cell development and differentiation. *Seminars in Hematology* 34, 2-12.
8. **Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G., and Dammacco, F.** (2001). Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483-489.
- 15 9. **Gearing, A., Thorpe, R., Bird, C., and Spitz, M.** (1985). Human B cell proliferation is stimulated by interleukin 2. *Immunology Letters* 9, 105-108.
10. **Hardy, R. R., and Hayakawa, K.** (2001). B cell development pathways. *Annual Review of Immunology* 19, 595-621.
- 20 11. **Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., and Paul, W. E.** (1982). Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine* 155, 914-923.
- 25 12. **Ikuta, K., Uchida, N., Friedman, J., and Weissman, I. L.** (1992). Lymphocyte development from stem cells. *Annual Review of Immunology* 10, 759-783.
13. **Jansen, J. H., Fibbe, W. E., Willemze, R., and Kluin-Nelemans, J. C.** (1990). Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut* 60, 269-274.
- 30 14. **Kincade, P. W., Lee, G., Pietrangeli, C. E., Hayashi, S., and Gimble, J. M.** (1989). Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annual Review of Immunology* 7, 111-143.
15. **LeBien, T. W.** (1998). B-cell lymphopoiesis in mouse and man. *Current Opinion in Immunology* 10, 188-195.
- 35 16. **Lu, R., and Serrero, G.** (1999). Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 256, 204-207.
- 40 17. **Lu, R., and Serrero, G.** (2000). Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3993-3998.
18. **Lu, R., and Serrero, G.** (2001). Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 142-147.
- 45 19. **May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Griening, G., and Sehgal, P. B.** (1988). Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/b-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 263, 7760-7766.
- 50 20. **May, L. T., Santhanam, U., Tatter, S. B., Ghrayeb, J., and Sehgal, P. B.** (1989). Multiple forms of human interleukin-6. Phosphoglycoproteins secreted by many different tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557, 114-119; discussion 119-121.
- 55 21. **Mingari, M. C., Gerosa, F., Carra, G., Accolla, R. S., Moretta, A., Zubler, R. H., Waldmann, T. A., and Moretta, L.** (1984). Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* 312, 641-643.
- 60 22. **Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K., and Kishimoto, T.** (1988). The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *Journal of Experimental Medicine* 167, 332-344.
- 65 23. **Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T.** (1996). Defects of Bcell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

## ES 2 369 695 T3

24. **Ohara, J., Coligan, J. E., Zoon, K., Maloy, W. L., and Paul, W. E. (1987).** High-efficiency purification and chemical characterization of B cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Journal of Immunology* 139, 1127-1134.
25. **Osmond, D. G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998).** Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunology Today* 19, 65-68.
26. **Ostberg, J. R., Barth, R. K., and Frelinger, J. G. (1998).** The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today* 19, 546-550.
27. **Parker, D. C. (1993).** T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology* 11, 331-360.
28. **Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., and Banchereau, J. (1988).** IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6880-6884.
29. **Rosenberg, N., and Kincade, P. W. (1994).** Blineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. *Current Opinion in Immunology* 6, 203-211.
30. **Ryan, D. H., Nuccie, B. L., Ritterman, I., Liesveld, J. L., and Abboud, C. N. (1994).** Cytokine regulation of early human lymphopoiesis. *Journal of Immunology* 152, 5250-5258.
31. **Takatsuki, F., Okano, A., Suzuki, C., Chieda, R., Takahara, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Hamuro, J., and Akiyama, Y. (1988).** Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigenspecific antibody responses *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology* 141, 3072-3077.
32. **Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., and Mond, J. J. (2000).** B-cell activation by T-cellindependent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews* 176,154-170.
33. **Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J. E., Lee, F., and Arai, K. (1986).** Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5894-5898.

### Referencias citadas en la descripción

*Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6309826 B [0017]

### Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, vol. 245, 539-543 [0018]
- **Ashman, L. K.** The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, vol. 31, 1037-1051 [0054]
- **Blackman, M. A.; Tigges, M. A.; Minie, M. E.; Koshland, M. E.** A model system for peptide hormone action in differentiation: interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell*, 1986, vol. 47, 609-617 [0054]
- **Burrows, P. D.; Cooper, M. D.** B cell development and differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 1997, vol. 9, 239-244 [0054]
- **Callard, R. E.** Immunoregulation by interleukin-4 in man. *British Journal of Haematology*, 1991, vol. 78, 293-299 [0054]
- **Conrad, D. H.; Waldschmidt, T. J.; Lee, W. T.; Rao, M.; Keegan, A. D.; Noelle, R. J.; Lynch, R. G.; Kehry, M. R.** Effect of B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) on Fc epsilon and Fc gamma receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *Journal of Immunology*, 1987, vol. 139, 2290-2296 [0054]
- **Cornall, R. J.; Goodnow, C. C.; Cyster, J. G.** The regulation of self-reactive B cells. *Current Opinion in Immunology*, 1995, vol. 7, 804-811 [0054]

## ES 2 369 695 T3

- **Duchosal**, M. A. B-cell development and differentiation. *Seminars in Hematology*, 1997, vol. 34, 2-12 [0054]
- **Frassanito**, M. A.; **Cusmai**, A.; **Iodice**, G.; **Dammacco**, F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*, 2001, vol. 97, 483-489 [0054]
- **Gearing**, A.; **Thorpe**, R.; **Bird**, C.; **Spitz**, M. Human B cell proliferation is stimulated by interleukin 2. *Immunology Letters*, 1985, vol. 9, 105-108 [0054]
- **Hardy**, R. R.; **Hayakawa**, K. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 2001, vol. 19, 595-621 [0054]
- **Howard**, M.; **Farrar**, J.; **Hilfiker**, M.; **Johnson**, B.; **Takatsu**, K.; **Hamaoka**, T.; **Paul**, W. E. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine*, 1982, vol. 155, 914-923 [0054]
- **Ikuta**, K.; **Uchida**, N.; **Friedman**, J.; **Weissman**, I. L. Lymphocyte development from stem cells. *Annual Review of Immunology*, 1992, vol. 10, 759-783 [0054]
- **Jansen**, J. H.; **Fibbe**, W. E.; **Willemze**, R.; **Kluin-Nelemans**, J. C. Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut*, 1990, vol. 60, 269-274 [0054]
- **Kincade**, P. W.; **Lee**, G.; **Pietrangeli**, C. E.; **Hayashi**, S.; **Gimble**, J. M. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annual Review of Immunology*, 1989, vol. 7, 111-143 [0054]
- **LeBien**, T. W. B-cell lymphopoiesis in mouse and man. *Current Opinion in Immunology*, 1998, vol. 10, 188-195 [0054]
- **Lu**, R.; **Serrero**, G. Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1999, vol. 256, 204-207 [0054]
- **Lu**, R.; **Serrero**, G. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, vol. 97, 3993-3998 [0054]
- **Lu**, R.; **Serrero**, G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, 142-147 [0054]
- **May**, L. T.; **Ghrayeb**, J.; **Santhanam**, U.; **Tatter**, S. B.; **Sthoeger**, Z.; **Helfgott**, D. C.; **Chiorazzi**, N.; **Griening**, G.; **Sehgal**, P. B. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, 7760-7766 [0054]
- **May**, L. T.; **Santhanam**, U.; **Tatter**, S. B.; **Ghrayeb**, J.; **Sehgal**, P. B. Multiple forms of human interleukin-6. Phosphoglycoproteins secreted by many different tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1989, vol. 557, 114-119 [0054]
- **Mingari**, M. C.; **Gerosa**, F.; **Carra**, G.; **Accolla**, R. S.; **Moretta**, A.; **Zubler**, R. H.; **Waldmann**, T. A.; **Moretta**, L. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*, 1984, vol. 312, 641-643 [0054]
- **Muraguchi**, A.; **Hirano**, T.; **Tang**, B.; **Matsuda**, T.; **Horii**, Y.; **Nakajima**, K.; **Kishimoto**, T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1988, vol. 167, 332-344 [0054]
- **Nagasawa**, T.; **Hirota**, S.; **Tachibana**, K.; **Takakura**, N.; **Nishikawa**, S.; **Kitamura**, Y.; **Yoshida**, N.; **Kikutani**, H.; **Kishimoto**, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996, vol. 382, 635-638 [0054]
- **Ohara**, J.; **Coligan**, J. E.; **Zoon**, K.; **Maloy**, W. L.; **Paul**, W. E. High-efficiency purification and chemical characterization of B cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Journal of Immunology*, 1987, vol. 139, 1127-1134 [0054]
- **Osmond**, D. G.; **Rolink**, A.; **Melchers**, F. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunology Today*, 1998, vol. 19, 65-68 [0054]

## ES 2 369 695 T3

• **Ostberg, J. R.; Barth, R. K.; Frelinger, J. G.** The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today*, 1998, vol. 19, 546-550 [0054]

• **Parker, D. C.** T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology*, 1993, vol. 11, 331-360 [0054]

• **Pene, J.; Rousset, F.; Briere, F.; Chretien, I.; Bonnefoy, J. Y.; Spits, H.; Yokota, T.; Arai, N.; Arai, K.; Banchereau, J.** IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, vol. 85, 6880-6884 [0054]

• **Rosenberg, N.; Kincade, P. W.** B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. *Current Opinion in Immunology*, 1994, vol. 6, 203-211 [0054]

• **Ryan, D. H.; Nuccie, B. L.; Ritterman, I.; Liesveld, J. L.; Abboud, C. N.** Cytokine regulation of early human lymphopoiesis. *Journal of Immunology*, 1994, vol. 152, 5250-5258 [0054]

• **Takatsuki, F.; Okano, A.; Suzuki, C.; Chieda, R.; Takahara, Y.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Hamuro, J.; Akiyama, Y.** Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology*, 1988, vol. 141, 3072-3077 [0054]

• **Vos, Q.; Lees, A.; Wu, Z. Q.; Snapper, C. M.; Mond, J. J.** B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*, 2000, vol. 176, 154-170 [0054]

• **Yokota, T.; Otsuka, T.; Mosmann, T.; Banchereau, J.; DeFrance, T.; Blanchard, D.; De Vries, J. E.; Lee, F.; Arai, K.** Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, vol. 83, 5894-5898 [0054]

## ES 2 369 695 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *ex vivo* para incrementar la proliferación de células B no tumorigénicas comprendiendo administrar una cantidad efectiva de PCDGF a dichas células donde la proliferación de dichas células es aumentada por encima del nivel basal de proliferación celular.
- 10 2. El método de la Reivindicación 1 donde dichas células son de sangre periférica, ganglios linfáticos, médula espinal, sangre de cordón umbilical o el bazo.
- 15 3. Los métodos de la Reivindicación 1 o 2, que además comprenden administrar una cantidad efectiva de un mitógeno de célula B donde la proliferación de células B es incrementada por encima de el nivel basal de proliferación celular.
- 20 4. Un método *ex vivo* de estimular síntesis de ADN en células B no tumorigénicas comprendiendo administrar una cantidad efectiva de PCDGF a dichas células en donde la síntesis de ADN es incrementada por encima del nivel basal de síntesis de ADN celular.
- 25 5. El método de la Reivindicación 4, en donde dichas células son de sangre periférica, ganglios linfáticos, médula espinal, sangre de cordón umbilical o el bazo.
- 30 6. Los métodos de la Reivindicación 4 o 5, que además comprenden administrar una cantidad efectiva de un mitógeno de células B en donde la síntesis de ADN es incrementada por encima del nivel basal de síntesis de ADN celular.
- 35 7. El método de la Reivindicación 1 donde dichas células son un cultivo de células B primarias.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

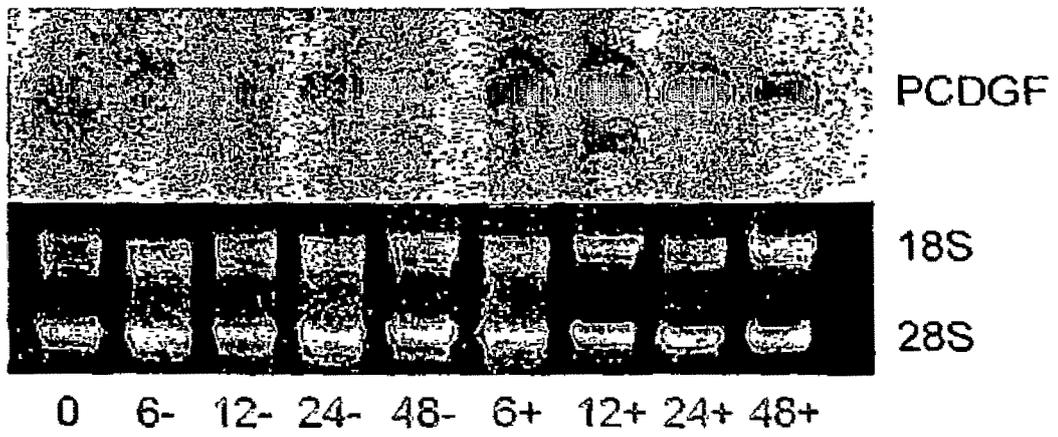


FIG. 1

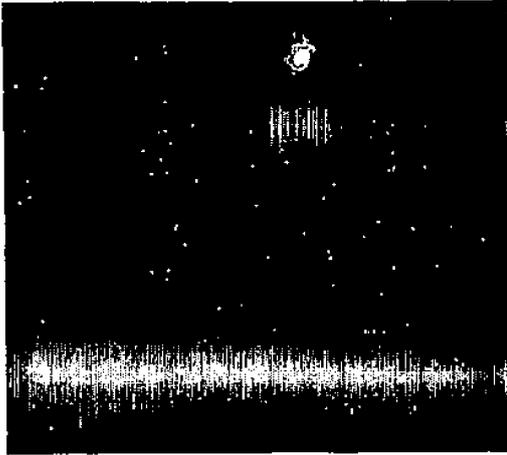


FIG. 2A

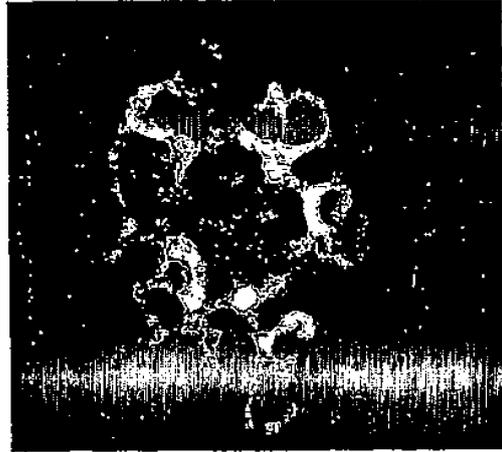


FIG. 2B

	24 horas	48 horas	72 horas
Con	511±111	474±83	127±6
10µg/ml LPS	11635±297	51215±1386	14314±1054
Veces de estimulación	23	108	113

FIG.3

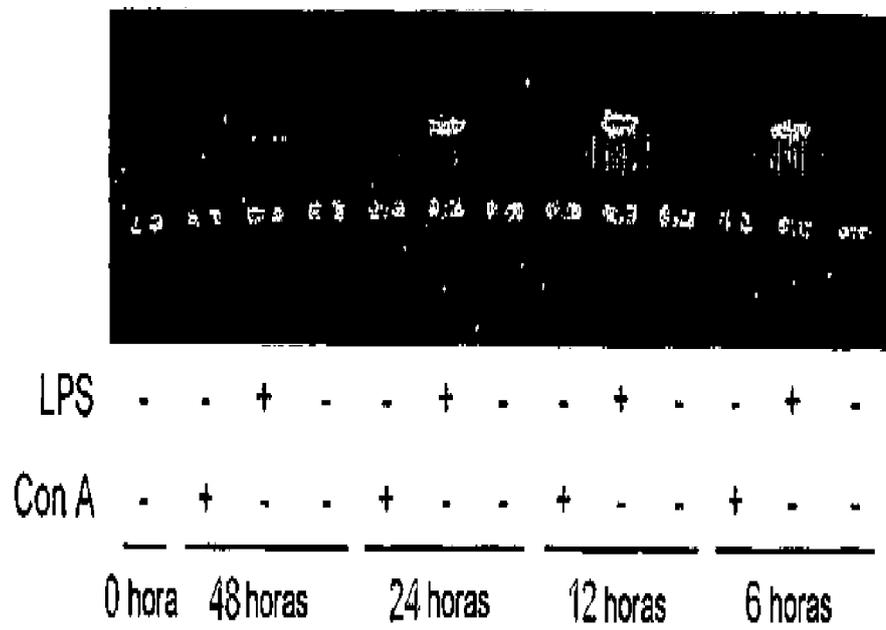
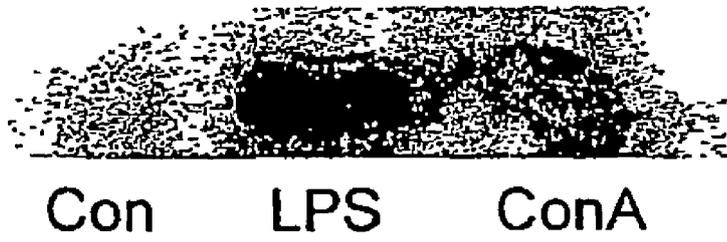


FIG.4



**FIG.5**

	Con	LPS	ConA
CPM	722±55	57845±3632	25668±1400
Veces de estimulación	1.0	80.1	35.6

FIG.6



FIG. 7A

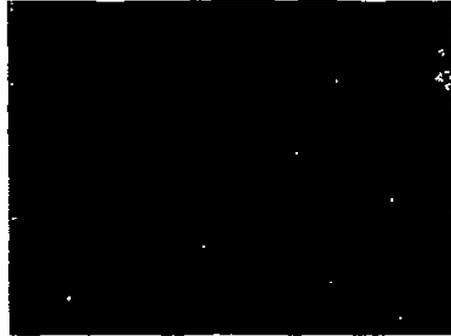


FIG. 7B

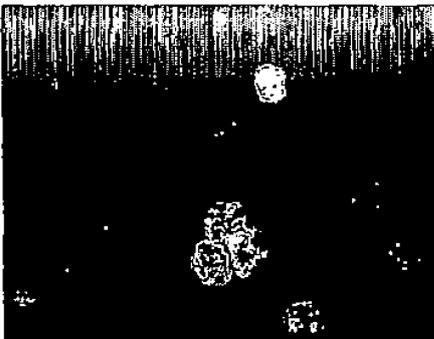


FIG. 7C

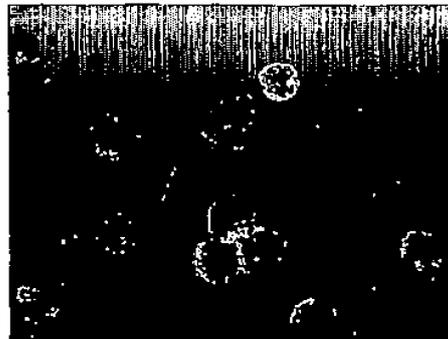


FIG. 7D

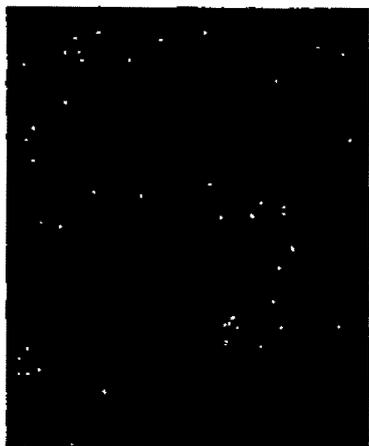


FIG. 8A

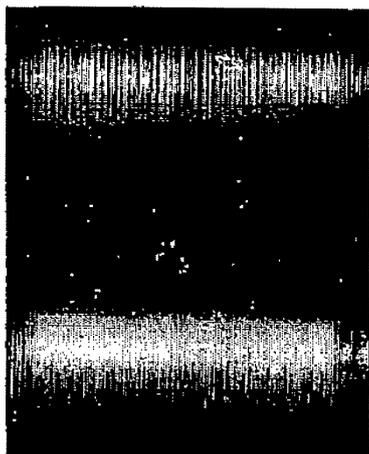


FIG. 8B

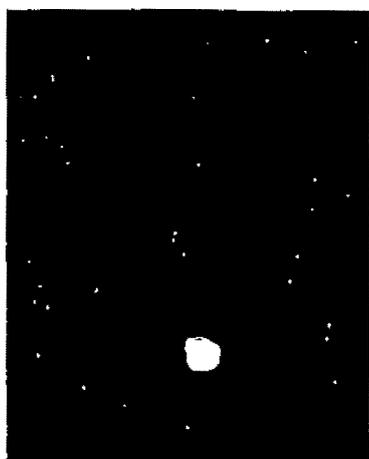


FIG. 8C



FIG. 8D

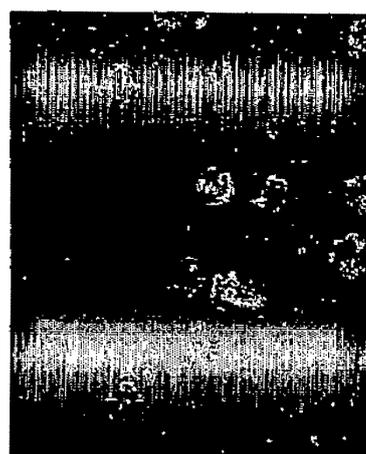


FIG. 8E

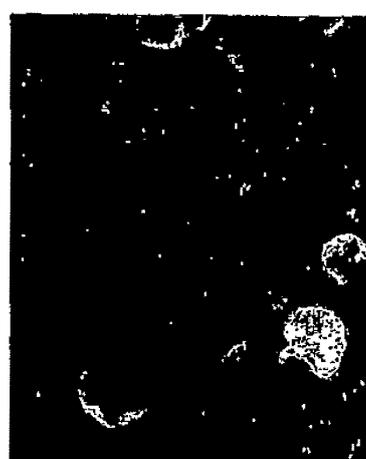


FIG. 8F

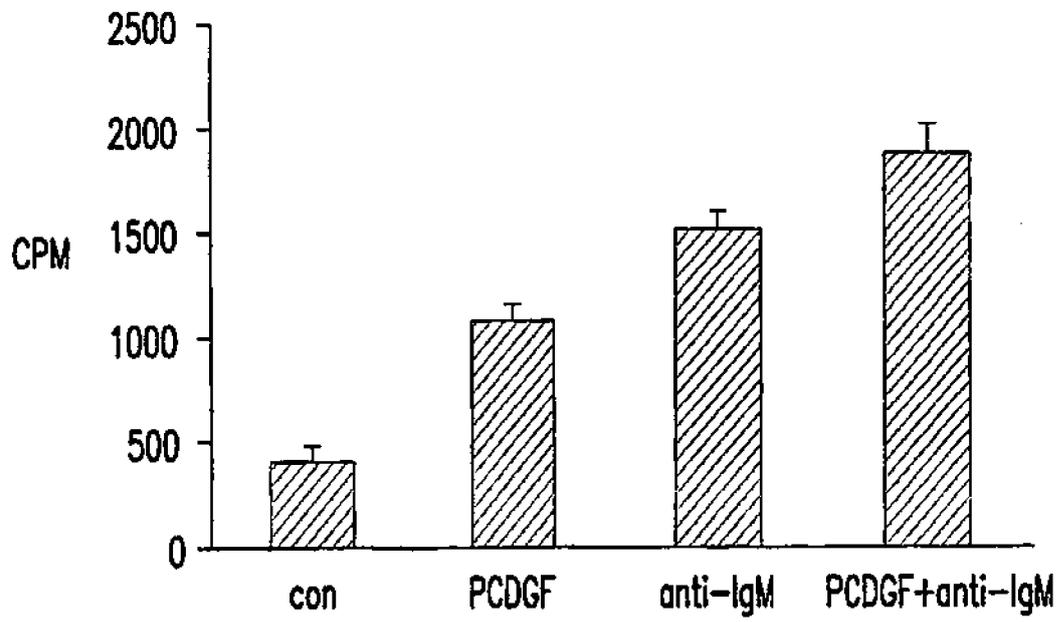


FIG.9