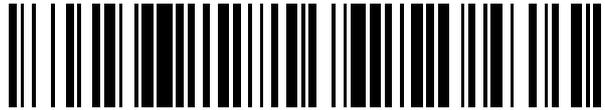


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 704**

51 Int. Cl.:

C12N 5/18 (2006.01)

C12N 5/26 (2006.01)

C12N 5/24 (2006.01)

C12N 5/28 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2010 PCT/AU2010/000715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10141989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010 E 10785597 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2440653**

54 Título: **Métodos de generación de células híbridas/quiméricas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.06.2009 AU 2009902652

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

29.05.2019

73 Titular/es:

**BTS RESEARCH INTERNATIONAL PTY LTD
(100.0%)**

**Suite G15, National Innovation Centre, Australian
Technology Park, 2-4 Cornwallis Street
Eveleigh, New South Wales 2015, AU**

72 Inventor/es:

**KASEKO, GALINA y
MAHAWORASILPA, TOHSAK L.**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 714 704 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 de generación de células híbridas/quiméricas y usos de los mismos

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a células híbridas y a métodos para producir células híbridas. En particular, la invención se refiere a células híbridas generadas a partir de la hibridación de al menos tres células donde al menos dos células derivan de diferentes linajes. La invención se refiere adicionalmente al uso de células híbridas para la expresión de proteínas útiles en una gama de aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, terapéuticas y/o de investigación.

Antecedentes

[0002] Cualquier análisis de la técnica anterior a lo largo de la memoria descriptiva no debe considerarse de ninguna manera como una admisión de que dicha técnica anterior es ampliamente conocida o de que forma parte del conocimiento general común en el campo.

[0003] Actualmente se usa una diversidad de diferentes tipos celulares para expresar proteínas que son comercialmente relevantes en una gama de aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, terapéuticas y/o de investigación. Actualmente, la producción de dichas proteínas se realiza habitualmente en células tales como células de bacterias, levaduras, hongos, insectos y mamíferos no humanos.

[0004] Las células modifican con frecuencia proteínas con una multitud de modificaciones postraduccionales que incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, acilación, fosforilación, metilación, sulfatación, prenilación y lipidación. Estas modificaciones son específicas de especie y, como tales, las células utilizadas actualmente en la producción de proteínas comercialmente relevantes presentan modificaciones postraduccionales que son distintas de las modificaciones postraduccionales observadas en proteínas expresadas a partir de células humanas o que se producen de forma natural en el cuerpo humano. Por ejemplo, muchos tipos celulares no de mamíferos utilizados para producir proteínas comercialmente relevantes carecen de la capacidad para glucosilar proteínas o presentan patrones de glucosilación que son diferentes de los patrones de glucosilación que presentan las proteínas expresadas en células humanas.

[0005] Incluso en sistemas de expresión de mamíferos no humanos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), se documentan diferencias significativas en los patrones de glucosilación en comparación con los de las células humanas. Por ejemplo, las estirpes celulares de CHO utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes carecen de una enzima sialiltransferasa funcional (α 2, 6) para la síntesis de ácidos siálicos terminales unidos en (α 2, 6) que están presentes en las células humanas. Además, los motivos de ácido siálico que están presentes en las glucoproteínas expresadas en células CHO son propensos a la degradación por una sialidasa endógena de células CHO (Gramer et al. *Biotechnology* 13 (7): 692-&, 1995).

[0006] Como resultado de los distintos repertorios de modificación postraduccional de los sistemas de expresión no humanos, las proteínas expresadas a partir de ellos pueden presentar características fisicoquímicas y farmacológicas tales como la vida media, la inmunogenicidad, la estabilidad y la eficacia funcional que son distintas de las proteínas derivadas de células humanas. Esto puede afectar sustancialmente a la utilidad clínica de estas proteínas.

[0007] También existen pruebas crecientes de que, además de su naturaleza dependiente de la especie, las modificaciones postraduccionales también pueden ser específicas de tejido e incluso específicas de tipo celular dentro de la misma especie. Esto es particularmente relevante para la expresión específica de tejido y específica de tipo celular de proteínas que presentan glucosilación terminal (Feizi *Nature* 314: 53-54, 1985; Rademacher et al *Annu Rev Biochem* 57: 785-838, 1988). Específicamente, se ha demostrado que tres sialiltransferasas, que unen ácidos siálicos terminales a cadenas de azúcar de glucoproteínas, presentan una expresión diferencial sorprendente en siete tejidos de la rata (Paulson et al *J. Biol. Chem.* 264: 10931-10934, 1989). Esto proporciona soporte para la glucosilación específica de tejido de la misma proteína. Además, los estudios con dos isoformas de una glucoproteína altamente fosforilada (osteopontina de ratón) expresada por fibroblastos de ratón y osteoblastos de médula ósea presentaron diferencias importantes en su grado de fosforilación, que se correlacionaban con diferencias en la actividad biológica. Estos resultados indican que la función de la osteopontina producida por diferentes tipos celulares es distinta (Christensen et al *J Biol. Chem.* 282 (27): 19463-19472).

[0008] Idealmente, los sistemas celulares adecuados para la producción de productos biológicos que presenten características completamente humanas deberían satisfacer una serie de criterios, incluyendo, pero no limitados a, los siguientes:

a) derivación de tejido humano;

- b) crecimiento de alta densidad en cultivo;
- c) presentan rendimientos de proteínas comercialmente viables;
- d) permiten la introducción de genes extraños estables;
- e) permiten métodos de amplificación de genes;

- 5 f) permiten el uso de una célula parental para la producción de anticuerpos monoclonales como en los hibridomas humano-humano;
- g) presentan expresión de proteínas estable a largo plazo;
- h) la capacidad de crecer en un medio sin suero y sin glutamina;
- i) carecen de actividad endopeptidasa, lo que reduce la degradación de proteínas,
- 10 j) están libres de agentes patógenos, incluyendo ADN vírico y micoplasma;
- k) producen proteínas que presentan modificaciones postraduccionales que son funcionalmente similares o iguales a las modificaciones postraduccionales que se producen en proteínas humanas de origen natural, preferentemente específicas de tejidos y células. Estas modificaciones postraduccionales pueden incluir, pero no se limitan a, restos de hidratos de carbono en glucoproteínas.

15 **[0009]** Si bien existe una serie de células hospedadoras humanas o heterohibridomas para la expresión de proteínas humanas, ninguna de ellas cumple satisfactoriamente todos los criterios enumerados anteriormente. En particular, los intentos de expresar y aislar proteínas de sistemas de expresión de células humanas existentes con rendimientos clínicamente útiles han dado como resultado un éxito limitado.

20 **[0010]** La expresión de proteínas en células eucariotas se controla en múltiples etapas, que incluyen: (a) la influencia de factores reguladores sobre los genes en la cromatina; (b) la regulación del inicio de la transcripción; y (c) la modificación postraducciona. Se piensa que estas etapas diferentes son específicas de la etapa de desarrollo y/o específicas de tejido. Por tanto, cuando un gen exógeno que codifica una proteína deseada se incorpora en una
 25 célula, la expresión de la proteína deseada puede ser inferior a óptima. Pueden producirse como resultado problemas tales como la falta de expresión estable (Li et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3650-3654, 1998; Miyaji et al., *Cytotechnology*, 3: 133-140, 1990; Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 173-180, 1990; Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 39-43, 1990; Satoh et al., *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993), bajos rendimientos de expresión (Airoldi et al, *Cancer Research* 61: 1285-1290, 2001; Hosoi et al. *Cytotechnology* 7: 25-32, 1991) y modificaciones postraduccionales no
 30 óptimas (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473, 2003). Todos estos factores pueden influir en la utilidad comercial potencial de la proteína.

[0011] Como ejemplo, se usó una subestirpe de células Namalwa (células linfoblastoides B humanas cultivadas en cultivos en suspensión y adaptadas a un medio sin suero y sin albúmina), Namalwa KJM-1, para la producción a
 35 gran escala de interferón alfa, que es una proteína endógena para las células de linfoma de Burkitt. Sin embargo, cuando se usó proteína G-CSF extraña para las células de linfoma de Burkitt pero endógena para las células B (Airoldi et al, *Cancer Research* 61: 1285-1290, 2001) como proteína dirigida para la transfección a través de electroporación, los niveles de expresión de G-CSF variaron entre múltiples clones resistentes a metotrexato (MTX) y el clon que más producía G-CSF tuvo una productividad específica de solamente 2,4 µg/ml/día cuando se adaptó a
 40 las condiciones sin suero.

[0012] Adicionalmente, la productividad específica se redujo en un cultivo de alta densidad cuando el número de células estaba por encima de 7×10^5 células/ml (Hosoi et al. *Cytotechnology* 7: 25-32, 1991). A pesar de que la concentración máxima notificada de G-CSF mejoró notablemente y alcanzó 41 µg/ml, con el fin de conseguir esto,
 45 se requirió una manipulación exhaustiva y laboriosa de las condiciones de cultivo celular con un control muy estricto del pH. También mostró que el medio utilizado para el crecimiento óptimo era diferente del utilizado para la producción óptima, creando de este modo un conflicto significativo entre la densidad alta y la velocidad de producción alta deseadas y dando como resultado un sistema industrialmente no viable.

50 **[0013]** Debido a que la expresión génica en eucariotas se controla en múltiples etapas, que incluyen: (a) disponibilidad y accesibilidad de los factores reguladores a los genes en la cromatina; (b) modulación en promotores accesibles de la velocidad de inicio específico de la transcripción; y (c) posteriormente eventos postranscripcionales en diversas etapas, la presencia de factores de transcripción específicos del tejido y específicos del desarrollo tiene una gran influencia sobre la expresión de los genes. Adicionalmente, la regulación génica de un tipo celular
 55 específico requiere la cooperación de varias secuencias reguladoras del ADN que actúan en cis, que son sitios de unión para proteínas que transmiten señales moleculares a los genes (Blackwood et al., *Science* 281: 60-63, 1998). Estas secuencias se unen a proteínas reguladoras para formar complejos conocidos como enhanceosomas (Marika et al., *Curr Opin Genet Dev* 11 (2): 205-208, 2001). Por tanto, cuanto más lejos esté el gen dirigido de su entorno celular habitual cuando se introduce en las células hospedadoras específicas del linaje humano, se reducen la
 60 expresión y la producción estables de la proteína deseada a altos niveles de producción. Cuando se transfectaron células Namalwa KJM-1 con genes de proteínas extrañas más lejos de ser proteínas específicas de linaje para estirpes celulares linfoblastoides tales como interferón beta (Miyaji et al., *Cytotechnology*, 3: 133-140, 1990; Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 173-180, 1990) o linfotóxina humana (Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 39-43, 1990) o pro-urocinasa (Satoh et al., *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993), se descubrió que la velocidad de transfección y la
 65 productividad celular eran aún menores.

- [0014]** La expresión eficiente de genes extraños en estirpes celulares específicas del linaje humano también requiere una selección cuidadosa y, a veces, tediosa de un potenciador/promotor adecuado que contenga sitios de unión para factores nucleares disponibles de células hospedadoras humanas. Encontrar un potenciador/promotor de este tipo aún podría dar como resultado una idoneidad limitada de un promotor de este tipo. Por ejemplo, cuando se investigaron varios potenciadores/promotores, tales como el promotor del gen temprano del virus de simio 40 (VS40), el promotor del gen inmediato-temprano principal del citomegalovirus humano (hCMV), el promotor del virus de la leucemia murina Moloney (Mo-MuLV), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) y el promotor de la β -actina de pollo, para determinar una expresión más eficiente de un gen extraño en las células Namalwa KJM-1, se descubrió que el promotor del Mo-MuLV era aproximadamente 10 veces más fuerte que el promotor temprano VS40 tradicional y los mayores clones productores alcanzaron una productividad de 30-40 $\mu\text{g}/10^6$ células/día (Satoh et al., *Cytotechnology* 18: 162-172, 1996). Sin embargo, el problema con el uso de vectores retrovíricos tales como el Mo-MuLV es que son difíciles de usar para la transfección de genes con secuencias de inversión (intrones) debido a su retirada por la maquinaria de corte y empalme nuclear (Li et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3650-3654, 1998).
- [0015]** La falta de coincidencia entre el entorno celular y el nuclear aumenta aún más en el caso de las proteínas codificadas por dos genes tales como los anticuerpos. Adicionalmente, aunque las células Namalwa KJM-1 se usaron para la generación de hibridomas humano-humano, los rendimientos de anticuerpos hicieron que esta estirpe celular no fuera adecuada para la producción industrial.
- [0016]** Como otro ejemplo, se ha demostrado que la estirpe celular de riñón embrionario humano 293 se transfecta muy fácilmente con genes de origen extraño con un alto grado de estabilidad. Sin embargo, las proteínas derivadas de 293 transfectantes tienen un uso limitado y por lo general son adecuadas para fines de investigación solamente porque las células 293 incluyen el adenovirus humano Ad5 ADN (células HEK 293). Sin embargo, la mayor limitación en el uso de las células 293 en un entorno comercial es su naturaleza adherente. Se ha realizado una serie de intentos para adaptar 293 células para una transfección eficiente en suspensión usando vehículos rentables tales como la polietilimimina (Durocher et al., *Nucleic Acids Res* 30 (2): e9, 2002; Schlaeger et al., *Cytotechnology* 30: 71-83, 1999) o fosfato de calcio (Girard et al., *Cytotechnology* 38: 15-21, 2002; Jordan et al., *Cytotechnology* 26: 39-47, 1998; Meissner et al., *Biotechnol Bioeng* 75 (2): 197-203, 2001). Sin embargo, estos vehículos solamente dan como resultado una expresión transitoria de proteínas recombinantes, lo que significa que la transfección debe repetirse para cada nuevo lote de cultivo sembrado. Con el fin de conseguir un crecimiento de la suspensión y una mayor expresión de proteínas cuando el oriP del VEB está presente en la cadena principal del vector, las células 293 tuvieron que ser modificadas genéticamente para expresar de forma estable la proteína EBNA1 del virus de Epstein Barr (293E) (Durocher et al., *Nucleic Acids Res* 30 (2): e9, 2002; Parham et al., *Cytotechnology* 35: 181-187, 2001; Schlaeger et al., *Cytotechnology* 30: 71-83, 1999). Incluso después de la transfección con EBNA1, las células 293E cuando se cultivan en medio sin suero (HEK293 EBNA1), (requisito previo para la producción a gran escala) presentan una velocidad de transfección muy escasa muy probablemente debido a la presencia de polianiones (heparina, sulfato de dextrano) que se añaden para evitar la agregación celular. Se han hecho intentos para mitigar este problema complementando el medio con peptonas obtenidas de la hidrólisis enzimática de fuentes animales tales como carne, gelatina y caseína (Pham et al., *Biotechnol Bioeng* 84 (3): 332-42, 2003). Cuando se usó la estirpe celular HEK293 EBNA1 para la producción de Tie-2 (receptor tirosina cinasa para factores de crecimiento de angiopoyetina) y neuropilina-1 ED (receptor que media la guía de células neuronales), la expresión de la proteína se vio limitada por los cultivos de baja densidad celular obtenidos en comparación con los obtenidos en cultivos no transfectados. Además, la pureza del >95 % de la proteína resultante es adecuada solamente para productos de calidad de investigación. Además, las células HEK293 EBNA1 no son adecuadas para la producción de anticuerpos monoclonales (mAb).
- [0017]** Las estrategias actuales para la producción de mAb terapéuticos incluyen el uso de sistemas de células de mamíferos (es decir, transfectomas CHO o NS0) para producir de forma recombinante mAb derivados de la inmunización de ratones transgénicos que llevan genes de Ig humana (xenoratonos), la humanización de mAb de roedores o a través de la selección de bibliotecas de mAb humanos (van Dijk et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 368-374, 2001). Si bien en términos de su secuencia, los mAb terapéuticos han evolucionado recientemente a anticuerpos quiméricos (regiones variables de roedores y constantes humanas), humanizados (secuencia humana excepto por regiones determinantes de la complementariedad de roedores) y completamente humanos (Ab humanos) para minimizar la respuesta alérgica, el aspecto importante de un mAb terapéutico es su capacidad para desencadenar funciones efectoras inmunitarias, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos que se ve comprometida si el mAb se produce en células hospedadoras no humanas que alteran su patrón de glucosilación nativo (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473, 2003). En vista de estos hechos, un escenario ideal es uno donde las células humanas producen anticuerpos terapéuticos. En este caso, los mAb completamente humanos podrían ejercer funciones efectoras humanas y tener una inmunogenicidad muy limitada debido a su estructura humana nativa.
- [0018]** Se ha notificado la generación de hibridomas o estirpes linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (VEB) derivados de células B humanas (Kirman et al., *Hybrid. Hybridomics* 21: 405-414, 2002; Boerner et al., *J. Immunol.* 147: 86-95, 1991; Zafiroopoulos et al., *J. Immunol. Methods* 200: 181-190, 1997). Sin embargo, hay información limitada acerca de la caracterización de estos mAb y las estirpes con respecto a su estabilidad a largo

plazo y su idoneidad para procesos de fabricación, especialmente los niveles de producción y la estabilidad de la secreción de Ig durante la fabricación de todo el lote. Si bien se han notificado estirpes celulares que producen mAb humanos contra GM-CSF humanos a un título acumulativo de 1,2 g/litro durante un período de 4 días, estas estirpes celulares derivaron de la hibridación de células somáticas (fusión) de células B humanas primarias con células K6H6/B5 de heteromiélinfoma (es decir, una estirpe celular de ratón-humano obtenida de una hibridación de un linfoma de células B humanas y una célula de mieloma de ratón (Li et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (10): 3557-3562, 2006).

[0019] En el caso de la transformación con VEB, la dificultad ha sido el establecimiento de una estirpe de células B humanas completamente inmortalizadas mientras se mantiene la producción estable de anticuerpos. Esto se debe a la baja eficacia de la inmortalización, la detención del crecimiento celular y la inmortalización dominante de células productoras de IgM. Adicionalmente, informes recientes han demostrado que la mayoría de las células B transformadas con VEB tienen telómeros más cortos y una esperanza de vida limitada, principalmente antes de 160 niveles de duplicación de la población (Sugimoto et al., *J Virol* 73: 9690-9691, 1999; Toda et al., *J Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 787: 197-206, 2003). Con el fin de superar este problema, se han hecho intentos de hibridar (o fusionar) células B transformadas con VEB con una estirpe celular compañera adecuada (sistema de expresión) pero, en efecto, estas estirpes celulares compañeras representan diversas combinaciones de heterohíbridos, tales como un trioma derivado de un heterohíbrido de ratón humano con una célula B humana (Ainai et al., *Hum Antibodies* 15: 139-154, 2006; Kalantarov et al., *Hum Antibodies* 11: 85-96, 2002; Karpas et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1799-1804, 2001). Cuando un trioma de este tipo se fusionó con células B transformadas con VEB primarias que producían un anticuerpo contra la toxina tetánica (TT), dio como resultado un tetroma que tenía una cuarta parte del componente del ratón. Aunque la producción estable de mAb contra TT fue posible después de la clonación consecutiva tres veces de los tetromas, dichas etapas repetidas de clonación de células son laboriosas y requieren mucho tiempo. Además, aunque las cantidades de mAb producidos por tetromas fueron suficientes con fines experimentales, los niveles fueron insuficientes para la producción a gran escala de mAb como agentes farmacéuticos. Todavía es cuestionable si la inmortalización en presencia del activador policlonal CpG 2006 o la co-ligadura de CD19 o BCR podrían dar como resultado un sistema completo para una producción eficiente de mAb específicos en volúmenes apropiados para su uso terapéutico (Hartman et al., *J Immunol* 164: 944-953, 2000; Hur et al., *Cell Prolif* 38: 35-45, 2005; Traggiai et al., *Nat Med* 10: 871-875, 2004).

[0020] Hering et al., *BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA* 47: 211-216, 1988 se relaciona con la fusión de la estirpe celular linfoblastoide B, Raji (linfoma de Burkitt) y la estirpe celular mieloide-eritroide K562 (subestirpe AB5). Se usaron híbridos de estas células para la producción de triomas cuando se fusionaron con células de bazo estimuladas humanas. El documento EP 0 292 965 A2 (CETUS CORPORATION, 1988) se refiere a una célula de trioma que comprende una célula de mieloma humano (U266), una célula B linfoblastoide transformada con VEB y una estirpe celular linfoblastoide que secreta IgG.

[0021] Se ha intentado una serie de enfoques para usar células humanas para la producción de sustancias biológicas tales como factores de crecimiento, anticuerpos y proteínas solubles.

[0022] Un objeto de la presente invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

[0023] De acuerdo con la invención, se proporciona una célula híbrida como se define en la reivindicación independiente 1 y un método de producción de una proteína como se define en la reivindicación independiente 15. En las reivindicaciones dependientes se proporcionan ejemplos de características preferidas u opcionales.

[0024] En general, se considera que las células de fusión múltiple son inestables y que cuantas más células están implicadas en una fusión, mayor es la inestabilidad de la célula híbrida resultante. Sorprendentemente, en la presente invención las células híbridas que son resultado de la fusión de una serie de células, por ejemplo, tres células, presentan estabilidad funcional. En particular, se ha descubierto que las células derivadas de diferentes linajes pueden fusionarse o hibridarse somáticamente para formar células quiméricas/híbridas sustancialmente estables. Más en particular, la presente invención se refiere a células quiméricas/híbridas de linaje cruzado generadas a partir de la hibridación de al menos tres células parentales que dan como resultado un tri-híbrido donde al menos dos células parentales derivan de diferentes linajes y en el que no se incluye una célula de mieloma en la hibridación.

[0025] También se ha descubierto sorprendentemente que las células quiméricas/híbridas estables de la invención tienen aplicaciones, por ejemplo, en la producción de proteínas que presentan modificaciones postraduccionales deseadas tales como, pero no limitadas a, patrones de glucosilación humanos.

[0026] También se ha descubierto sorprendentemente que los niveles de expresión de una proteína deseada en las células quiméricas/híbridas estables de la invención pueden potenciarse cuando una segunda proteína deseada

se expresa simultáneamente en las células quiméricas/híbridas de la invención. Además, los niveles de expresión de dos proteínas diana pueden potenciarse mediante la expresión simultánea de una tercera proteína deseada en las células híbridas/quiméricas de la invención.

5 **[0027]** En consecuencia, la presente invención proporciona ventajas significativas sobre sistemas conocidos anteriormente en términos de versatilidad y estabilidad de las células híbridas. Las células híbridas de la invención se producen mediante la fusión de dos células idénticas o dos células del mismo linaje y una célula de un linaje diferente. Un híbrido de este tipo está predispuesto a un fenotipo dirigido hacia el tipo de célula mayoritario utilizado en la hibridación. Estas células híbridas pueden usarse específicamente para expresar proteínas en las que se sabe
10 que las modificaciones postraduccionales específicas de tejido son importantes para la funcionalidad de la proteína. Por ejemplo, una citocina que se sabe que tiene una modificación postraduccional funcional específica cuando se expresa en una célula B puede expresarse más eficientemente en una célula híbrida que incluya al menos dos células derivadas de un linaje de células B, lo que garantiza una modificación postraduccional funcional.

15 **[0028]** Como la modificación postraduccional de proteínas puede ser específica de tejido o específica de tipo celular, será evidente para el experto en la materia que las células híbridas de la invención también pueden enriquecerse para un tipo de célula o un fenotipo particulares (como lo demuestra la presencia de marcadores CD específicos) para permitir la expresión de una proteína que presenta una modificación postraduccional deseada o una funcionalidad deseada asociada a un tipo celular o un fenotipo particulares.

20 **[0029]** En una realización, la presente invención se refiere a células híbridas que incluyen el uso de al menos una célula inmortalizada. Sin embargo, será evidente para el experto en la materia que la presente invención también se relaciona con la fusión de células no inmortalizadas que posteriormente pueden inmortalizarse mediante un proceso de transformación *in vitro*, tal como la introducción de genes víricos, por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (VEB),
25 antígeno T del virus de simio 40 (VS40), E1A y E1B de adenovirus y E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). Como alternativa, las células no inmortalizadas pueden inmortalizarse a través de la expresión de la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT). Las células inmortalizadas también pueden derivar de células en las que se ha modificado la expresión del oncogén. Las células inmortalizadas pueden derivar adicionalmente de cualquier acción que induzca una capacidad de crecimiento indefinido incluyendo, pero no limitada a, la exposición a
30 rayos UV o la transformación espontánea en la que no se conoce el mecanismo de la inmortalidad.

[0030] Será evidente que la presente invención se refiere en una realización a la fusión de tres células individuales. En una realización alternativa, la presente invención se refiere a la fusión de tres poblaciones de células en las que cada población incluye una pluralidad de tipos celulares idénticos. El experto en la materia entendería
35 que la fusión de poblaciones de células podría realizarse en cultivos celulares en masa. Las células híbridadas deseadas pueden identificarse y aislarse después, mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, a través de medios selectivos, tales como medio de hipoxantina aminopterina timidina (HAT). Como alternativa, pueden identificarse y aislarse células fusionadas mediante la identificación de marcadores celulares específicos, tales como los marcadores CD.

40 **[0031]** Será evidente que el aislamiento de las células en función de su expresión de marcadores tales como los marcadores CD, así como el enriquecimiento de una célula para un tipo celular o un fenotipo particulares, puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como métodos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

45 **[0032]** También será evidente que las células de la presente invención pueden transfectarse de forma estable o transitoria con ADN que codifica una proteína deseada. Estas células estables o transfectadas transitoriamente pueden identificarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante la inclusión de un gen indicador de selección en el ADN utilizado en la transfección. Dichos genes indicadores pueden incluir genes que
50 permitirían que las células transfectadas crezcan en un medio deficiente en compuestos, por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa (dhFr). Los indicadores también podrían incluir genes que confieran identificación visual de células transfectadas, por ejemplo, el gen de la luciferasa o un gen de proteína fluorescente verde (gfp). Como alternativa, el gen indicador podría conferir resistencia a un compuesto particular, por ejemplo, G418. Dichos genes indicadores son bien conocidos en la técnica.

55 **[0033]** En una realización preferida, las células híbridas de la invención pueden usarse para expresar anticuerpos monoclonales. Tradicionalmente, la producción de anticuerpos monoclonales se ha realizado a través de la fusión de una célula de mieloma y una célula B derivada del bazo de un animal inmunizado tal como un ratón. Sin embargo, la inestabilidad de las células de mieloma y, en particular, la inestabilidad genómica, pueden dar como resultado una
60 expresión menos que satisfactoria del anticuerpo deseado. Adicionalmente, debido a que las células animales se usan en la producción de hibridomas, los anticuerpos producidos presentan modificaciones postraduccionales no humanas. Los anticuerpos con modificaciones postraduccionales no humanas pueden dar como resultado problemas significativos cuando los anticuerpos se usan como agentes terapéuticos humanos. Estos problemas pueden incluir una función efectora reducida del anticuerpo, así como una inmunogenicidad que da como resultado
65 una semivida insatisfactoria *in vivo* y, por tanto, una eficacia reducida *in vivo*. También existe evidencia que sugiere

que los híbridos no pueden producirse satisfactoriamente en ausencia de una célula de mieloma. Las células híbridas de la invención han demostrado sorprendentemente que pueden producirse híbridos estables en ausencia de una célula de mieloma. Además, los anticuerpos expresados a partir de las células híbridas de la invención abordan los problemas asociados al uso de anticuerpos monoclonales producidos mediante hibridomas. Estos anticuerpos presentan modificaciones postraduccionales humanizadas y se expresan a partir de células que presentan estabilidad funcional.

[0034] De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de:

- una primera célula, en la que dicha primera célula es una célula madre o una célula derivada de una célula progenitora no comprometida;
- una segunda célula derivada de una célula progenitora linfoide común; y
- una tercera célula derivada de una célula progenitora linfoide común,

y en la que dicha primera célula no es una célula de mieloma.

[0035] En una realización, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide B y dicha tercera célula es una célula derivada del linaje linfoide B.

[0036] En otra realización, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide T y dicha tercera célula deriva del linaje linfoide T.

[0037] En otra realización, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide B y dicha tercera célula es una célula derivada del linaje linfoide T.

[0038] De acuerdo con la invención, dicha primera célula es una célula derivada de una célula progenitora mieloides común. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloides común o una célula madre y dos células linfoides B o dos linfocitos T. La divulgación también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloides común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0039] Preferentemente, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloides común, es una célula progenitora mielomonocítica, un monocito, un macrófago, un eosinófilo, un neutrófilo, una célula dendrítica o un basófilo. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0040] Preferentemente, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloides común muestra al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloides común que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14 y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloides común que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0041] En una realización, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloides común es un monocito. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un monocito y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un monocito, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0042] En otra realización, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloides común es un progenitor mielomonocítico primario. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico primario y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico primario, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0043] En una realización, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloides común es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula inmortalizada seleccionada entre un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula inmortalizada seleccionada entre un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo, una

célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0044] En otra realización, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloide común deriva del bazo, la sangre periférica, el cordón umbilical o la médula ósea. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común derivada de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común derivada de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T.

[0045] En otra realización, dicha célula derivada del linaje linfoide B es una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B ingenua, una célula B activada o una célula B efectora. Propiamente dicho, es evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o una célula madre y dos células linfoides B seleccionadas entre una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula B efectora. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B seleccionada entre una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula B efectora y un linfocito linfoide T.

[0046] En una realización, dicha célula B efectora es una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B seleccionadas entre una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática y un linfocito linfoide T.

[0047] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide B muestra al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B que muestran al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5 y un linfocito linfoide T.

[0048] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide T es un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T seleccionado entre un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos linfocitos linfoides T seleccionados entre un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector.

[0049] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide T muestra al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos linfocitos linfoides T seleccionados entre linfocitos T que muestran al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8.

[0050] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide B es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B, al menos una de las cuales puede ser una célula inmortal. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B inmortal y un linfocito linfoide T.

[0051] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide T es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T inmortal.

[0052] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfoide B deriva de tejido linfoide. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B derivadas de tejido linfoide. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, célula linfoide B

derivada de tejido linfóide y un linfocito linfóide T.

[0053] En una realización, dicha célula derivada del linaje linfóide T deriva de tejido linfóide. Propiamente dicho, la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre, tejido de células linfoides B y un linfocito linfóide T derivado de tejido linfóide.

[0054] Cuando las células linfoides B o T incluidas en las células híbridas de la invención derivan de tejido linfóide, dicho tejido linfóide se selecciona preferentemente entre sangre periférica, cordón umbilical, bazo, médula ósea, timo, amígdalas, adenoides y ganglios linfáticos locales.

10

[0055] En una realización, al menos una de las células incluidas en la generación de la célula híbrida de la invención es una célula humana. También será evidente que, en una realización, la célula híbrida de la invención puede incluir al menos una célula de ratón.

15 **[0056]** En una realización, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común es una célula K562. Propiamente dicho, será evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula K562 y dos células linfoides B. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula K562, una célula linfóide B inmortal y un linfocito linfóide T.

20 **[0057]** En una realización, dicha segunda célula o dicha tercera célula es una célula WIL2-NS o una célula MOLT4. Propiamente dicho, será evidente que la invención proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre, una célula WIL2-NS y un linfocito linfóide T. La invención también proporciona una célula híbrida generada mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre, una célula linfóide B y una célula MOLT4.

25

[0058] En una realización, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula MOLT4.

30 **[0059]** En otra realización, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula B primaria y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

[0060] En otra realización, dicha primera célula es un monocito humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

35 **[0061]** En otra realización, dicha primera célula es un progenitor mielomonocítico humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T humano primario.

[0062] En otra realización, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

40

[0063] En otra realización, dicha primera célula es un monocito primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula WIL2-NS.

45 **[0064]** En otra realización, dicha primera célula es un monocito de ratón primario, dicha segunda célula es una célula SP2 y dicha tercera célula es un linfocito T de ratón primario.

[0065] En otra realización, dicha primera célula es un monocito de ratón primario, dicha segunda célula es una célula SP2 y dicha tercera célula es una célula SP2.

50 **[0066]** En otra realización, dicha primera célula es un monocito humano o de ratón primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula SP2.

[0067] En una realización, la célula híbrida de la invención expresa una proteína deseada. En otra realización, la célula híbrida de la invención expresa más de una proteína deseada. En determinadas realizaciones, la célula híbrida de la invención expresa dos proteínas deseadas. En otras realizaciones, la célula híbrida de la invención expresa tres proteínas deseadas. En una realización, dicha proteína deseada es una proteína endógena y cuando se expresa más de una proteína deseada, al menos una de las proteínas deseadas es una proteína endógena. En otra realización, dicha proteína es una proteína recombinante y cuando se expresa más de una proteína deseada, al menos una de las proteínas deseadas es una proteína recombinante. Preferentemente dicha proteína es una citocina, por ejemplo, un factor estimulante de colonias o una interleucina. En una realización, dicha proteína es GM-CSF. En otra realización, dicha proteína es interleucina 2. En otra realización más, dicha proteína es un receptor o fragmento de la misma. En una realización, dicha proteína es un receptor soluble. En una realización adicional, dicha proteína es una inmunoglobulina.

65 **[0068]** En una realización, dicha proteína es una cadena alfa del receptor de IL-4 humano. En otra realización,

dicha proteína es IgM. En otra realización más, dicha proteína es IgG. En una realización adicional más, dicha proteína es CD54.

5 **[0069]** En una realización en la que la célula híbrida de la invención expresa más de una proteína deseada, preferentemente las proteínas deseadas se seleccionan entre una citocina, un factor estimulante de colonias, una interleucina o un receptor o fragmento de la misma. En una realización particular, las proteínas deseadas son una inmunoglobulina tal como IgM y en particular IgM soluble humana; una citocina, por ejemplo, una interleucina y en particular interleucina-2 (IL-2) y más en particular IL2 humana; y/o un receptor, en particular un receptor de interleucina y más en particular un receptor de interleucina humana e incluso más en particular el receptor alfa de
10 interleucina-4 humana (IL-4Ra).

[0070] El experto en la materia entenderá que las células híbridas de la invención no se limitan a expresar proteínas particulares deseadas ni se limitan a expresar un determinado número de proteínas. Además, será
15 evidente para el experto en la materia que la expresión simultánea de proteínas deseadas de las células híbridas de la invención puede dar como resultado la potenciación de los niveles de expresión de proteínas deseados.

[0071] En una realización, dicha hibridación utilizada para generar la célula híbrida de la invención se consigue por medios eléctricos. En otra realización, dicha hibridación para generar la célula híbrida de la invención se consigue por medios químicos.
20

[0072] En una realización, la célula híbrida de la invención se hibrida adicionalmente con una célula que expresa una proteína de interés.

[0073] En una realización particular, la célula híbrida de la invención se hibrida con un linfocito B que presenta
25 antígeno CD25.

[0074] En una realización particularmente preferida, la célula híbrida de la invención muestra el antígeno CD25 y expresa una inmunoglobulina. En una realización adicional, la célula híbrida de la invención se hibrida con un linfocito B que presenta antígeno CD25 y la célula resultante expresa una inmunoglobulina.
30

[0075] En una realización, dicha hibridación utilizada para generar la célula híbrida de la invención se realiza mediante la hibridación de tres células individuales.

[0076] En otra realización, dicha hibridación utilizada para generar la célula híbrida de la invención se realiza usando tres poblaciones de células en las que cada una de dichas poblaciones incluye una pluralidad de tipos celulares o fenotipos idénticos.
35

[0077] En una realización, dicha célula híbrida de la invención se enriquece para un marcador particular que define el tipo celular para permitir la expresión de una proteína que presenta una modificación postraducciona deseada o una funcionalidad deseada.
40

[0078] En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una proteína, comprendiendo dicho método la etapa de expresar una proteína en una célula híbrida de acuerdo con la invención.

45 **[0079]** En otro aspecto, la invención proporciona una proteína cuando se produce en una célula híbrida de acuerdo con la invención.

[0080] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida de acuerdo con la divulgación en la que dicho método incluye la etapa de hibridar:
50

- una primera célula, en la que dicha primera célula es una célula madre o una célula derivada de una célula progenitora no comprometida;
- una segunda célula derivada de una célula progenitora linfoide común; y
- una tercera célula derivada de una célula progenitora linfoide común,

55 y en la que dicha primera célula no es una célula de mieloma.

[0081] En un ejemplo del método de la divulgación, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide B y dicha tercera célula es una célula derivada del linaje linfoide B.
60

[0082] En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide T y dicha tercera célula deriva del linaje linfoide T.

[0083] En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide B y dicha tercera célula es una célula derivada del linaje linfoide T.
65

[0084] Preferentemente, dicha primera célula es una célula derivada de una célula progenitora mielóide común. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o una célula madre y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la
5 hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0085] Preferentemente, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común, es una célula progenitora mielomonocítica, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la
10 hibridación de un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0086] Preferentemente, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14 y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la
20 hibridación de una célula progenitora mielóide común que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD16, CD15 o CD14, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0087] En un ejemplo, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común es un monocito. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la
25 hibridación de un monocito y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de un monocito, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0088] En otro ejemplo, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común es un progenitor mielomonocítico primario. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico primario y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de un progenitor mielomonocítico primario, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0089] En un ejemplo, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula inmortalizada seleccionada entre un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una
40 célula inmortalizada seleccionada entre un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.

[0090] En otro ejemplo, dicha célula derivada de una célula progenitora mielóide común deriva del bazo, la sangre periférica, el cordón umbilical o la médula ósea. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un
45 método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común derivada de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea y dos células linfoides B o dos linfocitos linfoides T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común derivada de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea, una célula linfóide B y un linfocito linfóide T.
50

[0091] En otro ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfóide B es una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula B efectora. Propiamente dicho, es evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o una célula madre y dos células linfoides B seleccionadas entre una célula pre-B, una
55 célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula B efectora. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre, una célula linfóide B seleccionada entre una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula B efectora y un linfocito linfóide T.

[0092] En un ejemplo, dicha célula B efectora es una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre y dos células linfoides B seleccionadas entre una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mielóide común o célula madre,
60 una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática y un linfocito linfóide T.
65

- [0093]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide B presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B que presentan al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD19, CD20, CD72 o CD5 y un linfocito linfoide T.
- [0094]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide T es un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T seleccionado entre un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos linfocitos linfoides T seleccionados entre un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector.
- [0095]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide T presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T que presenta al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos linfocitos linfoides T seleccionadas entre linfocitos T que presentan al menos uno de los siguientes antígenos CD CD3, CD4, CD5 o CD8.
- [0096]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide B es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B, al menos una de las cuales puede ser una célula inmortal. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B inmortal y un linfocito linfoide T.
- [0097]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide T es una célula inmortalizada. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y un linfocito linfoide T inmortal.
- [0098]** En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide B deriva de tejido linfoide. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre y dos células linfoides B derivadas de tejido linfoide. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B derivada de tejido linfoide y un linfocito linfoide T. En un ejemplo, dicha célula derivada del linaje linfoide T deriva de tejido linfoide. Propiamente dicho, la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, tejido de células linfoides B y un linfocito linfoide T derivado de tejido linfoide.
- [0099]** Cuando las células linfoides B o T incluidas en el método de producción de una célula híbrida de la divulgación derivan de tejido linfoide, dicho tejido linfoide se selecciona preferentemente entre sangre periférica, cordón umbilical, bazo, médula ósea, timo, amígdalas, adenoides y ganglios linfáticos locales.
- [0100]** En un ejemplo, al menos una de las células incluidas en el método de producción de una célula híbrida de la divulgación es una célula humana. También será evidente que, en una realización, el método de producción de una célula híbrida de la divulgación puede incluir al menos una célula de ratón.
- [0101]** En un ejemplo, dicha célula derivada de una célula progenitora mieloide común es una célula K562. Propiamente dicho, será evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula K562 y dos células linfoides B. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula K562, una célula linfoide B inmortal y un linfocito linfoide T.
- [0102]** En un ejemplo, dicha segunda célula o dicha tercera célula es una célula WIL2-NS o una célula MOLT4. Propiamente dicho, será evidente que la divulgación proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula WIL2-NS y un linfocito linfoide T. La divulgación también proporciona un método de producción de una célula híbrida mediante la hibridación de una célula progenitora mieloide común o célula madre, una célula linfoide B y una célula MOLT4.

[0103] En un ejemplo, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula MOLT4.

[0104] En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula B primaria y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

[0105] En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un monocito humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

10 **[0106]** En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un progenitor mielomonocítico humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T humano primario.

15 **[0107]** En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario.

[0108] En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un monocito primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula WIL2-NS.

20 **[0109]** En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un monocito de ratón primario, dicha segunda célula es una célula SP2 y dicha tercera célula es un linfocito T de ratón primario. En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un monocito de ratón primario, dicha segunda célula es una célula SP2 y dicha tercera célula es una célula SP2.

25 **[0110]** En otro ejemplo del método de la divulgación, dicha primera célula es un monocito humano o de ratón primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula SP2.

Definiciones

30 **[0111]** En el contexto de la presente invención, las expresiones "comprende", "que comprende" y similares han de interpretarse en su sentido inclusivo, en oposición a su sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero no limitado a".

Célula híbrida

35

[0112] Una célula híbrida es una célula que comprende componentes de más de un genoma (distintos de los cigotos y derivados de los mismos). Es una célula que se construye a partir de una hibridación de células somáticas (o una hibridación de células completas) de, por ejemplo, dos o más células biológicas (células parentales). Las células parentales pueden obtenerse de un mismo linaje (o especie) o de un linaje (o especie) diferente. La célula híbrida creada a partir del mismo linaje y especie se denomina auto-híbrido, mientras que la de diferentes linajes se denomina hetero-híbrido.

Célula quimérica

45 **[0113]** Una célula quimérica es una célula híbrida producida de forma artificial con un genoma que se origina a partir de dos o más especies diferentes.

Célula híbrida de linaje cruzado

50 **[0114]** Una célula híbrida de linaje cruzado es una célula híbrida producida de forma artificial con un genoma que se origina a partir de dos o más células derivadas de diferentes linajes celulares. Las células hematopoyéticas se dividen en dos linajes principales: linfoide (linfocitos T, células B y linfocitos NK) y mieloide (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas).

55 *Célula tri-híbrida*

[0115] Una célula tri-híbrida es una célula híbrida producida de forma artificial con un genoma que se origina a partir de tres células.

60 *Estable*

[0116] Cuando se refiere a una célula, el término "estable" denota la capacidad de una célula para demostrar la uniformidad de un determinado parámetro de crecimiento o productividad, o la uniformidad de las características del producto de la estirpe celular con un número de generación creciente. Cuando se usa en referencia a un transfectante estable, denota una estirpe celular que expresa un transgén a un nivel relativamente constante

sustancialmente indefinido.

Hibridación de células somáticas

5 **[0117]** En el contexto de la presente solicitud, la expresión "hibridación de células somáticas" se refiere a un proceso en el que se crea una única célula viable a partir de dos o más células diploides (no gametos) (células parentales) de manera que se induzca que las membranas plasmáticas de las células estén en contacto estrecho, se induzca una ruptura reversible de las membranas plasmáticas de las células parentales en el punto de contacto simultáneamente y se combinen las entidades u orgánulos de cada célula parental dentro de la envoltura de la célula
10 única recién formada. La célula única recién formada se denomina célula hibridada o célula híbrida.

Célula madre

[0118] La expresión "célula madre" se refiere a una célula no especializada con capacidad para dividirse por mitosis y para desarrollarse en una gama de diferentes tipos celulares. Las células madre pueden incluir células madre embrionarias, células madre "adultas" derivadas de cordón umbilical o células madre derivadas de adultos. Las células madre incluyen células no humanas que tienen una capacidad ilimitada para diferenciarse en todos los tipos celulares, es decir, células totipotentes no humanas. Las células madre también pueden incluir células que están limitadas en su capacidad para diferenciarse en células especializadas, por ejemplo, células madre
20 pluripotentes, multipotentes, oligopotentes o unipotentes.

Célula inmortalizada

[0119] La expresión "célula inmortalizada" se refiere a una célula que tiene una capacidad de crecimiento indefinido. Será evidente que una célula inmortalizada puede derivar de una malignidad *in vivo* o un embrión no humano. Como alternativa, una célula inmortalizada puede derivarse realizando una acción en una célula que induzca una capacidad de crecimiento indefinido. Estas acciones pueden incluir, por ejemplo, procesos de transformación *in vitro*, por ejemplo, la introducción de genes víricos tales como el virus de Epstein-Barr (VEB), el antígeno T del virus de simio 40 (VS40), E1A y E1B de adenovirus y E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH).
30 Como alternativa, una célula inmortalizada puede derivar de una célula a través de la expresión de la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) u otros medios. Las células inmortalizadas también pueden derivar de células en las que se ha modificado la expresión del oncogén. Las células inmortalizadas pueden derivar de cualquier acción que induzca una capacidad de crecimiento indefinido incluyendo, pero no limitada a, la exposición a rayos UV o la transformación espontánea en la que no se conoce el mecanismo de inmortalidad.

Célula de mieloma

[0120] La expresión "célula de mieloma" se refiere a una malignidad de una célula plasmática.

Hibridoma

[0121] El término "hibridoma" se refiere a una célula que se produce mediante la hibridación de una célula de mieloma y una célula B derivada del bazo de un animal inmunizado. Los hibridomas son células inmortalizadas con capacidad para producir anticuerpos monoclonales.

Célula progenitora no comprometida

[0122] La expresión "célula progenitora no comprometida" se refiere a un descendiente temprano de una célula madre que solo puede diferenciarse en tipos limitados de células sin estar comprometido con ningún linaje específico, pero que ya no puede renovarse.

Células progenitoras mieloides comunes

[0123] Una célula progenitora mieloides común es una progenie de una célula madre hematopoyética restringida al linaje mieloides y capaz de dar origen a progenitores ya sea de megacariocitos/eritrocitos o de granulocitos/macrófagos, pero no a células linfoides.

Progenitor linfoide común

[0124] Un progenitor linfoide común es una progenie de las células madre hematopoyéticas restringida al linaje linfoide y que da origen a células B, linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales, pero no a células mieloides.

Célula derivada del linaje linfoide B

[0125] Una célula derivada del linaje linfoide B es cualquier célula que se origina a partir de un progenitor linfoide

común después de su compromiso de linaje B para convertirse en cualquier tipo de células B.

Célula derivada del linaje linfoide T

- 5 **[0126]** Una célula derivada del linaje linfoide T es cualquier célula que se origina a partir de un progenitor linfoide común después de su compromiso de linaje T para convertirse en cualquier tipo de linfocitos T.

Célula progenitora de granulocitos-macrófagos

- 10 **[0127]** Una célula progenitora de granulocitos-macrófagos es una célula progenitora que se origina a partir de una célula progenitora mieloide común y que está comprometida con los linajes de granulocitos y monocitos, pero no con los linajes megacariocítico y eritroide.

Célula progenitora de megacariocitos-eritroide

- 15 **[0128]** Una célula progenitora de megacariocitos-eritroide es una célula progenitora que se origina a partir de una célula progenitora mieloide común y que está comprometida con los linajes megacariocítico y eritroide, pero no con los linajes de granulocitos y monocitos.

20 *Célula pre-B*

[0129] Una célula pre-B es una célula B en desarrollo en la etapa en la que la cadena pesada de IgM unida a membrana se expresa con una cadena ligera sustituta.

25 *Célula B inmadura*

[0130] Una célula B inmadura se refiere a una célula B en desarrollo en la médula ósea en la que en la etapa de recombinación de anticuerpos los loci VJ se reorganizan en cadenas L y los VDJ se reorganizan en cadenas H, se presenta la expresión del receptor IgM.

30

Célula B indiferenciada

[0131] Una célula B indiferenciada es una célula B madura que se ha diferenciado y madurado en la médula ósea a través de un reordenamiento génico aleatorio de su inmunoglobulina de superficie, pero que aún no ha encontrado antígeno afín en la periferia.

35

Célula B activada

[0132] Un tipo de célula B madura que ha encontrado su antígeno afín en la periferia a través del reconocimiento de antígenos a través de BCR, dando como resultado una combinación de proliferación clonal y diferenciación terminal en células plasmáticas de forma dependiente o independiente de T.

40

Célula B efectora

- 45 **[0133]** Una célula efectora B es con frecuencia sinónimo de una célula plasmática que secreta anticuerpos, un tipo de célula B de corta duración que secreta anticuerpos específicos para un antígeno particular, así como una gran cantidad de citocinas para implicar otras células del sistema inmunitario.

Célula B de memoria

50

[0134] Una célula B de memoria es una célula B de larga vida formada a partir de una célula B activada que es específica del antígeno encontrado durante la respuesta inmunitaria primaria y es capaz de proporcionar una respuesta rápida después de una segunda exposición al mismo antígeno.

55 *Célula plasmática*

[0135] Una célula plasmática es una célula postmitótica terminal, de corta vida, del sistema inmunitario, que se diferencia a partir de una célula B tras la estimulación por linfocitos CD4+ (linfocitos Th) y segrega una gran cantidad de anticuerpos.

60

Linfocito pre-T

[0136] Un linfocito pre-T es un linfocito T en desarrollo en la etapa en la que VbDbJb está completa y la cadena beta de TCR se expresa en un linfocito T (CD3⁺) doble negativo (CD4⁻CD8⁻).

5

Linfocito T inmaduro

[0137] Un linfocito T inmaduro es un linfocito T en desarrollo que ha migrado de la médula ósea al timo pero que no ha completado la reorganización de su TCR o la selección de su capacidad de unión de TCR a los autopéptidos presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o ha experimentado el compromiso con los linajes T citolítico o T auxiliar que se correlacionan precisamente con la especificidad de TCR de una célula hacia las moléculas del CMH de clase I o II, respectivamente. El compromiso de linaje está marcado fenotípicamente por la pérdida de expresión de una de las moléculas correceptoras, CD8 o CD4.

15 *Linfocito T indiferenciado*

[0138] Un linfocito T maduro que se ha diferenciado en la médula ósea y que ha experimentado satisfactoriamente los procesos positivos y negativos de la selección central en el timo con una nueva concordancia de su TCR y la pérdida de una de las moléculas correceptoras, pero aún no ha encontrado un antígeno afín en la periferia.

20

Linfocito T activado

[0139] Un linfocito T activado es un linfocito T que, a través de la implicación tanto de TCR como de CD28 en la superficie celular por el péptido del complejo mayor de histocompatibilidad (complejo péptido:CMH) y miembros de la familia B7 en las células presentadoras de antígeno, respectivamente, se establece convirtiéndose en un linfocito T efector específico de antígeno.

25

Linfocito T efector

30 **[0140]** Un linfocito T efector es un tipo de linfocito T de vida corta que puede responder inmediatamente tras el contacto con células que llevan el complejo péptido:CMH apropiado para la célula.

Breve descripción de las figuras35 **[0141]**

- Figura 1. Identificación y células K562 CD71⁺ purificadas por clasificación.
 Figura 2. Perfiles de FACS de células K562 positivas para CD15 y CD71; (a) aproximadamente el 18 % de la población original de células K562 enriquecidas con CD71 fue positiva para CD15 (región R1) y (b) reanálisis de células K562 positivas para CD15 después de dos meses en cultivo.
 40 Figura 3. Expresión de CD15 en células mononucleares de LMA CD34⁺.
 Figura 4. Un perfil de FACS de CD16 y ventanas de clasificación para diferentes poblaciones de células CD14⁺ aisladas por perlas magnéticas de CD14 (MACS).
 Figura 5. Un perfil de FACS de células mononucleares de sangre de cordón umbilical teñidas con anticuerpos anti-CD19 humano de ratón y anticuerpos anti-CD5 humano de ratón.
 45 Figura 6. Un perfil de FACS de células de sangre de cordón umbilical mononucleares teñidas con anticuerpos anti-CD3 humano de ratón y anti-CD5 humano de ratón.
 Figura 7. Un perfil de FACS de células mononucleares de médula ósea teñidas con anticuerpos anti-CD20 humano de ratón y anti-CD72 humano de ratón.
 50 Figura 8. Un perfil típico de FACS de células mononucleares amigdalinas para CD3 y CD54.
 Figura 9. Identificación de linfocitos cultivados positivos para IgM e IgG; (A) después de 5 días de cultivo, el 18 % de las células CD19⁺ fueron positivas para IgM y el 1 % tenía IgG detectable sobre la superficie celular y; (B) después de 10 días en cultivo, el porcentaje de linfocitos positivos para IgM se redujo al 2 % y el porcentaje de células positivas para IgG aumentó al 15 %.
 55 Figura 10. Perfiles de FACS de expresiones de CD sobre células tri-híbridas KMW con oncogén de fuentes mieloides y linfoides.
 Figura 11. Expresión de CD4 y CD19 sobre linfocitos primarios de bazo mixtos, poblaciones de CD4 y CD19 clasificados y una estirpe celular tri-híbrida KBT resultante; (a) expresión de CD4 y CD19 sobre linfocitos primarios de bazo (b) perfil de pureza de células CD19⁺ clasificadas (98,1 %); (c) perfil de pureza de células CD4⁺ clasificadas (96,8 %); (d) coexpresión de CD19 y CD4 sobre las células tri-híbridas. Más del 99 % de la población de células tri-híbridas coexpresa marcadores tanto para células B como para linfocitos T
 60 Figura 12. Expresiones de CD19, CD3 y CD5 sobre células tri-híbridas KBT derivadas de células mieloides inmortales y 2 células linfoides experimentadas con antígeno primario; (a) expresión de CD19 y CD5 sobre la superficie de células tri-híbridas KBT, (b) expresión de CD3 y CD5 en el tri-

65

- híbrido de KBT.
- Figura 13. Expresiones en superficie de CD4, CD8, CD72 y CD20 sobre células tri-híbridas KBT derivadas de células mieloides inmortales y 2 células linfoides primarias derivadas de médula ósea y timo; (a) expresión de CD4 y CD8, (b) expresión de CD4 y CD72, (c) expresión de CD20 y CD8.
- 5 Figura 14. Perfiles de FACS de expresiones de CD sobre una estirpe tri-híbrida WTM con oncogén de fuente linfóide y CD4 y CD14 de células primarias; (a) coexpresión de CD19 y CD4 sobre las células tri-híbridas que muestra una población de células CD19 con alto nivel de expresión de CD4 (CD19 CD4^H) y otra con bajo nivel de expresión de CD4 (CD19 CD4^L) y; (b) coexpresión de CD4 y CD14 sobre la misma población de tri-híbridos positiva para CD19 que muestra una mayor heterogeneidad de la población celular basada en la expresión alta o baja de CD14 (CD4^HCD14^L; CD4^HCD14^H; CD4^LCD14^H).
- 10 Figura 15. Perfiles de FACS típicos de expresiones de CD sobre las células tri-híbridas WTM con oncogén WIL2-NS de fuente linfóide, CD5 derivado de linfocitos T con experiencia antigénica y CD14 derivado de células monocíticas primarias.
- 15 Figura 16. Perfiles de FACS de expresiones de CD en células tri-híbridas WTM con oncogén de WIL2NS de fuente linfóide, CD8 derivado de linfocitos T citotóxicos y CD14 derivado de células monocíticas primarias.
- Figura 17. Un perfil de FACS de coexpresión de CD4 y CD8 en los tri-híbridos de WTM derivados de linfocitos T doble positivos para CD.
- 20 Figura 18. Expresiones de CD sobre la superficie de células tri-híbridas WTM que se originan a partir de células progenitoras mielomonocíticas; tinción tricolor con CD19, CD4 y CD15 y (B) tinción tricolor con CD34 y CD15 derivados de progenitor mielomonocítico y CD4 derivados de linfocitos T efectores.
- Figura 19. La expresión de marcadores específicos de linaje de células tri-híbridas KWT derivadas de linfocitos T efectores CD4⁺.
- 25 Figura 20. Expresiones de marcadores específicos de linaje de células tri-híbridas KWT derivadas de linfocitos T CD4⁺ CD8⁺ doble positivos.
- Figura 21. Una expresión de marcadores específicos de linaje de células tri-híbridas KWT derivadas de linfocitos T con experiencia con antígeno CD5⁺.
- Figura 22. Perfil de expresión de CD típico de células tri-híbridas WWM que se originan a partir de dos células, conteniendo cada una oncogén linfóide y una célula monocítica primaria; (a) coexpresión de CD19 y CD14 sobre las células tri-híbridas (región R1) que muestran una población distinta de células positivas para CD19 que no expresan CD14 (región R2); (b) expresión de CD14 sobre células tri-híbridas derivadas de las células clasificadas en la región R1 y expandidas en el cultivo durante 2 meses y; (c) falta de CD14 de superficie sobre las células tri-híbridas derivadas de la población clasificada de la región R2 2 meses después.
- 30 Figura 23. RT-PCR representativa para CD14 obtenido de diferentes subpoblaciones de células tri-híbridas WWM.
- Figura 24. Un cariotipado de un único clon de células K562. Los resultados indicaron que la estirpe celular K562 era triploide, que tenía un número modal de 69 cromosomas. Se detectaron las siguientes anomalías cromosómicas: falta un cromosoma X; inversión paracéntrica del brazo largo del cromosoma 2, que implica las bandas q33 y q35; falta el cromosoma 3, un cromosoma 5 derivado adicional con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q11.2; una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; un cromosoma 7 adicional con una inversión paracéntrica del brazo corto del cromosoma 7 que implica las bandas p13 y p22; falta un cromosoma 9; una supresión terminal del brazo corto del cromosoma 9 de la banda p13; un cromosoma 9 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de dos cromosomas 9; un derivado del cromosoma 10 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 10; falta el cromosoma 13; material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; falta el cromosoma 14; material adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de p13 en dos cromosomas 17; un cromosoma 18 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 18; falta un cromosoma 20; un cromosoma 21 derivado resultante de la translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 21; falta un cromosoma 22; cinco cromosomas marcadores diferentes adicionales.
- 35 Figura 25. Un cariotipado de uno de los cinco clones de la estirpe celular WIL2NS. En este clon (CLON 1), se detectaron las siguientes anomalías; un cromosoma 8 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 8; un homólogo extra del cromosoma 13; un derivado del cromosoma 14 resultante de la translocación que implica segmentos de los cromosomas 5 y 14; una duplicación del cromosoma 17 del segmento de q22-q23.
- 40 Figura 26. Un cariotipado de la estirpe tri-híbrida KBT-1 (CD19⁺) y (CD4⁺), que muestra un clon de una única célula casi triploide. El recuento de cromosomas varió de 65 a 66 debido a la pérdida aleatoria, pero tuvo un número modal de cromosomas de 66. Se detectaron las siguientes anomalías cromosómicas: un X derivado formado a partir de una translocación compleja que implica el brazo corto del cromosoma X y posiblemente otros 2 cromosomas no identificados; falta un cromosoma X; inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 2 que implica las bandas q33 y q35; falta el cromosoma
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

3; supresión del cromosoma 3p; un cromosoma 4 derivado que implica segmentos del cromosoma 4 y otro cromosoma no identificado; un cromosoma 5 derivado adicional con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q11.2; una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; un cromosoma 7 derivado adicional que implica el brazo largo del cromosoma 7 y el brazo largo del marcador 3; falta un cromosoma 13; material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; falta un cromosoma 14; falta un cromosoma 15; material adicional de origen desconocido reemplaza el segmento de p13 en dos cromosomas 17; un cromosoma 18 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 18; falta un cromosoma 20; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 21; falta el cromosoma 22; cuatro cromosomas marcadores diferentes adicionales.

Figura 27.

Cariotipo de tri-híbrido de linaje cruzado de KBT (células K562 y CD20⁺CD72⁺ y CD4⁺CD8⁺) (o linaje cruzado de KBT-2), que muestra cuatro clones casi triploides, (A) el CLON 1 tiene un número modal de cromosomas de 67 y las siguientes anomalías cromosómicas: un derivado X formado a partir de una translocación compleja que implica el brazo corto del cromosoma X y posiblemente otros dos cromosomas no identificados; falta un cromosoma X; un cromosoma 1 derivado que implica segmentos del cromosoma 1 y, muy probablemente, del cromosoma 4; Inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 2, que implica las bandas q33 y q35; falta un cromosoma 3; lo más probable es que un cromosoma 4 suprimido sea un cromosoma 4 derivado pequeño; un cromosoma 5 derivado adicional con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q11.2; una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; un cromosoma 7 derivado adicional que implica el brazo largo del cromosoma 7 y el brazo largo del marcador 3; falta un cromosoma 9; una supresión terminal del brazo corto del cromosoma 9 de la banda p13; un cromosoma 9 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de dos cromosomas 9; un cromosoma 10 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 10; falta un cromosoma 13; material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; falta un cromosoma 14; el material adicional de origen desconocido reemplaza el segmento de p13 en dos cromosomas 17; un cromosoma 18 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 18; falta un cromosoma 20; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 21; falta un cromosoma 22; cuatro cromosomas marcadores diferentes adicionales (B) el CLON 2 contiene 65 a 67 cromosomas debido a la pérdida aleatoria (el número modal de cromosomas es 67) y tiene características cromosómicas similares al CLON 1, con la excepción de que el cromosoma 4 suprimido del CLON 1 está sustituido por un cromosoma 4 derivado definido que implica segmentos del cromosoma 4 y otro cromosoma no identificado, (C) el CLON 3 es esencialmente igual al CLON 1 pero falta el cromosoma 1 derivado y hay un cromosoma 4 derivado diferente derivado de segmentos de los cromosomas 1 y 4. Contiene de 67 a 68 cromosomas debidos a la pérdida aleatoria con un número modal de 67, (D) el CLON 4 es esencialmente igual al CLON 1 pero falta un cromosoma 1 y un cromosoma 1 derivado diferente resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 4. Hay solo dos cromosomas 5 normales y un cromosoma 5 derivado que parece ser un 5q satelital.

Figura 28.

Un cariotipado de la estirpe tri-híbrida KWT-1 (células mieloides y linfoides B inmortalas y linfocitos T CD4⁺ maduros primarios derivadas del tri-híbrido de KWT), que muestra un único clon que es casi hexaploide con un número modal de 129 a 140 cromosomas y las siguientes anomalías cromosómicas: faltan dos cromosomas X; falta un cromosoma 1; falta un cromosoma 2; inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 2, que implica las bandas q33 y q35; faltan dos cromosomas 3; falta un cromosoma 4; un cromosoma 4 derivado con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q35; un homólogo extra del cromosoma 5; dos derivados adicionales del cromosoma 5 con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q11.2; un homólogo extra del cromosoma 6; un cromosoma 6 adicional con una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; un homólogo extra del cromosoma 7; dos cromosomas 7 con una inversión paracéntrica del brazo corto del cromosoma 7 que implica las bandas p13 y p22; un cromosoma 8 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 8; faltan dos cromosomas 9; una supresión terminal del brazo corto del cromosoma 9 de la banda p13; dos cromosomas 9 derivados resultantes de una translocación que implica segmentos de dos cromosomas 9; un derivado del cromosoma 10 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 10; falta un cromosoma 12; un cromosoma 13 con material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; faltan dos cromosomas 14; un derivado del cromosoma 14 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 5 y 14; falta un cromosoma 15; falta un cromosoma 17; dos cromosomas 17 con material adicional de origen desconocido que reemplazan el segmento de p13 en dos cromosomas 17; dos cromosomas 17 con una duplicación en el segmento de q22-q23; faltan dos cromosomas 18; un cromosoma 20 adicional; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los

cromosomas 1 y 21; falta un cromosoma 22; siete cromosomas marcadores adicionales con dos copias del cromosoma 2 marcador.

Figura 29.

Un cariotipado de KWT-2 (células mieloides y linfoides B inmortales y linfocitos T CD3⁺CD5⁺ de memoria primarios derivadas de la estirpe tri-híbrida KWT), que muestra un único clon que es casi hexaploide con un número modal de 135 a 142 cromosomas y las siguientes anomalías cromosómicas: faltan dos cromosomas X; falta un cromosoma 1; falta un cromosoma 2; inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 2, que implica las bandas q33 y q35; faltan dos cromosomas 3; falta un cromosoma 4; un cromosoma 4 derivado con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q35; un homólogo adicional del cromosoma 5; dos derivados adicionales del cromosoma 5 con material cromosómico adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de q11.2; un homólogo adicional del cromosoma 6; un cromosoma 6 adicional con una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; dos cromosomas 7 con una inversión paracéntrica del brazo corto del cromosoma que implica las bandas p13 y p22; un cromosoma 8 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 8; faltan dos cromosomas 9; una supresión terminal del brazo corto del cromosoma 9 de la banda p13; dos cromosomas 9 derivados resultantes de una translocación que implica segmentos de dos cromosomas 9; un derivado del cromosoma 10 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 10; falta un cromosoma 12; un cromosoma 13 con material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; faltan dos cromosomas 14; un derivado del cromosoma 14 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 5 y 14; falta un cromosoma 15; falta un cromosoma 17; dos cromosomas 17 con material adicional de origen desconocido que reemplazan el segmento de p13 en dos cromosomas 17; dos cromosomas 17 con una duplicación en el segmento de q22-q23; faltan dos cromosomas 18; un cromosoma 20 adicional; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 21; falta un cromosoma 22; ocho cromosomas marcadores adicionales con dos copias del cromosoma 2 marcador.

Figura 30.

Cariotipado de la estirpe tri-híbrida KWT-3 (células mieloides y linfoides B inmortales y linfocitos T CD4⁺CD8⁺ doble positivo primarios derivadas del tri-híbrido de KWT), que muestra tres clones que son hiperpentaploides con un número modal de cromosomas de 124 a 139. (A) El CLON 1 tiene las siguientes anomalías cromosómicas: tres cromosomas X y un único cromosoma Y; un cromosoma 1 adicional; dos cromosomas 2 adicionales; inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 2, que implica las bandas q33 y q35; falta un cromosoma 3; un derivado adicional del cromosoma 5 resultante de una translocación que implica el cromosoma 5 y un cromosoma de origen desconocido; un cromosoma 6 adicional; una duplicación de un segmento del brazo corto del cromosoma 6 entre las bandas p21.2 y p23; una inversión paracéntrica adicional del brazo corto del cromosoma 7 que implica las bandas p13 y p22; un cromosoma 8 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 8; una supresión terminal del brazo corto del cromosoma 9 de la banda p13; un cromosoma 9 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de dos cromosomas 9; dos cromosomas 10 adicionales; dos derivadas del cromosoma 10 resultantes de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 10; dos cromosomas 13 adicionales; un material cromosómico adicional de origen desconocido en el brazo corto de un cromosoma 13; falta un cromosoma 14; un derivado del cromosoma 14 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 5 y 14; un material adicional de origen desconocido que reemplaza el segmento de p13 en tres cromosomas 17; dos cromosomas una duplicación del cromosoma 17 en el segmento de q22-q23; un cromosoma 18 adicional; un cromosoma 18 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 18; un cromosoma 19 adicional; falta un cromosoma 20; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 21; cinco cromosomas marcadores adicionales con dos copias de cada cromosoma marcador 4 y 5. (B) El CLON 2 tiene anomalías cromosómicas similares a las del CLON 1 excepto porque perdió un cromosoma 9. (C) El CLON 3 contiene las mismas anomalías cromosómicas que el CLON 2 excepto porque la inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma se reemplaza con un cromosoma 2 isoderivado resultante de la formación de un isocromosoma que implica un cromosoma 2 derivado que se generó mediante una inversión paracéntrica en el brazo largo, que implica las bandas q33 y q35.

Figura 31.

Cariotipados de tri-híbridos de WWM (A) y su subestirpe enriquecida con CD14 (B) que muestran un único clon dominante que aumenta su presencia del 55 % en el tri-híbrido de WWM original al 95 % en su subestirpe enriquecida con CD14. Cada uno tiene un número modal de 47 cromosomas y las siguientes anomalías cromosómicas: un derivado del cromosoma 8 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 1 y 8; un homólogo adicional del cromosoma 13; un derivado del cromosoma 14 resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 5 y 14; una duplicación del cromosoma 17 del segmento de q22-23; un cromosoma 21 derivado resultante de una translocación que implica segmentos de los cromosomas 3 y 21. La única diferencia entre el tri-híbrido de WWM original y su subestirpe CD14⁺ enriquecida es que estas anomalías están presentes en solo el 55 % de las células en el WWM original y en el 95 % de las células de la subestirpe enriquecida con CD14. El resto de las células del tri-híbrido de WWM varían

desde casi triploides (con pérdida aleatoria de cromosomas) hasta casi tetraploides (con pérdida aleatoria de cromosomas).

- Figura 32. Transferencia Western de sobrenadantes de cultivos de ProGM. Los carriles 1 y 2 se cargaron con sobrenadantes de cultivos de linfocitos T humanos de 4 días no activados y activados, respectivamente. Los carriles 4 y 5 contenían sobrenadantes de cultivos de ProGM cultivados en ausencia o en presencia de tunicomicina, respectivamente. El sobrenadante de células que no expresaban GM-CSF se usó en el Carril 3. Como referencia, se usó hGM-CSF recombinante (10 ng) derivado de *E. coli* en el carril 6.
- Figura 33. Electroforesis en gel de GM-CSF humano producido por la estirpe híbrida de ProGM. Los sobrenadantes celulares de la estirpe híbrida de ProGM obtenidos de las muestras que se cultivaron con (carriles 3 y 4) y sin (carriles 1 y 2) tunicamicina se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GM-CSF humano de rata (carriles 1 y 3) y anticuerpo anti-GM-CSF de ratón de rata (carriles 2 y 4). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata.
- Figura 34. Expresión de CD4 y CD54 sobre la superficie de la estirpe de células ProCD54 y su subestirpe enriquecida con CD54, ProCD54EX; (a) el 100 % de las células ProCD54 conservaron la expresión de CD4. Aproximadamente el 72 % de la población celular también fue positiva para CD54 con niveles variables de expresión de bajos a altos. El 42 % de la población celular con características de fenotipo CD4⁺CD54⁺ con niveles medios a altos de expresión de CD54 se seleccionaron y clasificaron, y (b) el análisis de la expresión de CD4 y CD54 de la superficie de la subestirpe CD4⁺CD54⁺ clasificada del ProCD54 original muestra que el 98 % de las células siguen siendo positivas para ambos marcadores después de más de 6 meses de cultivo.
- Figura 35. Transferencia Western de CD54 humano soluble secretado por células ProCD54 y ProCD54EX. Se usaron las células de la estirpe celular compañera del tri-híbrido de KWT como control. Tanto las células ProCD54 como las ProCD54EX arrojaron una forma soluble de CD54 de aproximadamente 82 kDa.
- Figura 36. Un análisis por RT-PCR de la expresión del gen de ICAM-1 en células ProCD54 y ProCD54EX.
- Figura 37. Análisis por transferencia Western de extractos celulares de una estirpe celular de tri-híbrido de KBT transfectada transitoriamente con cadena hIL4-R α , 24, 48 y 72 horas después de la transfección. Se usó PBML humano estimulado con hIL4 100 ng/ml y células KBT no transfectadas como control positivo y negativo para la cadena de hIL4-R α , respectivamente.
- Figura 38. Una salida de PCR para la detección de ARNm de hIL-2 en las células de tri-híbrido de KBT transfectadas con hIL-2. Los niveles de expresión son similares a los obtenidos a partir de linfocitos T humanos CD8⁺ y células Jurkat. Se usaron células KBT no transfectadas y células K562 como controles negativos.
- Figura 39. El análisis por FACS para determinar hIL-2 intracelular en (a) células tri-híbridas de KBT originales y (b) células KBT TR-IL2. Aproximadamente el 41 % de las células KBT fueron positivas para la molécula de activación de CD69. El 92 % de las células KBT TR-IL2 se tiñeron de forma positiva para hIL-2 intracelular (R1+R2). Las células negativas para hIL-2 eran parte de la población positiva para CD69, mientras que las células negativas para CD69 eran todas positivas para hIL2 intracelular.
- Figura 40. Perfil de elución resultante después de RP-HPLC tras absorción de afinidad para hGM-CSF.
- Figura 41. SDS-PAGE (panel inferior) y transferencia Western (panel superior) de fracciones recogidas después de RP-HPLC tras inmovinabsorción de afinidad para hGM-CSF. La transferencia Western reveló cambios en el perfil de peso molecular de hGM-CSF secretado por Pro-GM-SF entre fracciones. Las fracciones eluidas a los 24 a 28 minutos correspondieron a un primer pico en el perfil de elución de RP-HPLC, las fracciones recogidas entre 29 y 31 minutos representaron el segundo pico, mientras que el tercer pico cayó en las fracciones recogidas entre 34 y 36 minutos.
- Figura 42. Separación de células CD4⁺ del cultivo de linfocitos humanos activados por PHA: (A) las células marcadas con CD4-FITC antihumano se seleccionaron (R1) y se clasificaron del resto de la población celular. Las células clasificadas se analizaron adicionalmente para determinar su pureza; (B) el 100 % de las células en la población clasificada fueron positivas para CD4.
- Figura 43. Electroforesis en gel de hGM-CSF desglucosilado derivado de Pro-GMsf. El hGM-CSF purificado se expuso a la digestión con PHGasa F durante un período de tiempo diferente. Carril 1 – 0 min, carril 2 – 10 min, carril 3 – 20 min, carril 4 – 40 min de incubación. Carril 5 - GM-CSF humano recombinante derivado de *E. coli*. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Se indican los marcadores de peso molecular.
- Figura 44. Identificación y clasificación de células Tfr⁺ de la estirpe celular Sp2 de mieloma de ratón.
- Figura 45. Perfiles de FACS de células mononucleares de ratón de (a) sangre periférica y (b) bazo teñido con anti-CD4 y CD8 de ratón. Las regiones seleccionadas R1 y R3 representan un único linfocito T auxiliar efector positivo (CD4⁺CD8⁻) y linfocitos T citotóxicos (CD8⁺CD4⁻), mientras que R2 contiene linfocitos T doble positivo (CD4⁺CD8⁺).
- Figura 46. Perfiles de pureza de monocitos de ratón aislados de sangre periférica mediante selección negativa con perlas magnéticas. El 100 % de las células aisladas fueron positivas para CD11b y al mismo tiempo más del 98 % de estas células fueron negativas para B220, CD90, CD49b y NK1.1. Aproximadamente, el 38 % de las células CD11b⁺ expresaron Ly5G en su superficie en niveles bajos.
- Figura 47. Perfiles de FACS de expresión de CD138, CD4 y Cd11b en tri-híbrido de STmMm derivado de una

- célula inmortal linfoide de Sp2, linfocito T CD4⁺ de ratón primario y monocito CD11b⁺. El fenotipo del linaje linfoide B se confirmó mediante la expresión de CD138 en el 100 % de las células tri-híbridas, (a) y (b) al menos el 82 % de la población celular expresó los tres marcadores CD, siendo solo el 5 % de las células positivas para CD138 sin coexpresar ya sea CD4 o CD11b.
- 5 Figura 48. Perfiles de FACS típicos de expresión de CD138, CD8 y CD11b en tri-híbrido de STmMm derivado de una célula inmortal linfoide de ratón de Sp2, linfocito T CD8⁺ citotóxico de ratón primario y monocito de CD11b⁺ de ratón. Mientras que la expresión de CD138 de ratón se confirmó en el 97-100 % de las células tri-híbridas (a) y (b), la coexpresión de marcadores de linfocitos T y monocitos se detectó en el 56 % y 57 % de población de células tri-híbridas, respectivamente. Aproximadamente el 40 % de la población del tri-híbrido completo coexpresó los tres marcadores (c) y solamente el 14 % no expresó ni CD8 ni CD11b en su superficie.
- 10 Figura 49. Perfiles de FACS típicos de expresión de CD138, CD8 y CD11b en tri-híbridos de STmMm derivados de una célula inmortal linfoide de ratón de Sp2, un linfocito T CD4⁺CD8⁺ doble positivo de ratón primario y un monocito CD11b⁺ de ratón primario. El 98-100 % de la población de células tri-híbridas fue positiva para CD138 siendo el 93 % de la población también positiva para CD8 (b). Aproximadamente el 57-60 % de la población celular total fue simultáneamente positiva para CD138, CD8 y CD11b.
- 15 Figura 50. Un perfil típico de expresión de CD4 y CD8 sobre la superficie de tri-híbridos de STmMm derivados de una célula inmortal linfoide de ratón de Sp2, un linfocito T CD4⁺CD8⁺ doble positivo de ratón primario y un monocito primario. Mientras que el 95 % de las células fueron positivas para CD8, solo el 50 % de la población de tri-híbridos coexpresó CD4 y CD8. En particular, prácticamente toda la población de CD4⁺ también fue positiva para CD8.
- 20 Figura 51. Un perfil típico de expresión de CD138 y CD11b en la superficie de tri-híbridos de SSMm donde el 93 % de la población de tri-híbrido muestra una tinción positiva para CD138 con el 70 % de células que coexpresan CD11b.
- 25 Figura 52. Perfiles típicos de expresión de CD71 humano y TfR de ratón sobre la superficie de tri-híbridos de SWMm (a) y SWMh (b). Independientemente de la fuente de ratón o humana del monocito, el 100 % de los tri-híbridos fueron positivos para el receptor de transferrina tanto humano como de ratón.
- Figura 53. Perfiles típicos de expresión de CD138 de ratón en tri-híbridos de SWMm (a) y SWMh (b) y ya sea CD11b de ratón o CD14 humano. La expresión de CD138 de ratón parece depender de la fuente de ratón o humana del monocito. Mientras que el 84 % de los tri-híbridos de SWMm fueron positivos para CD138 de ratón, solo el 29 % de SWMh lo tenía sobre su superficie.
- 30 Figura 54. Un perfil de FACS de expresión de CD19 humano y de CD14 humano sobre la superficie de tri-híbridos quiméricos de SWMh muestra que el 96 % de las células expresan CD19 humano coexpresando el 66 % de CD14 humano.
- 35 Figura 55. Un sistema de manipulación/entrega de una célula individual.
- Figura 56. Una micropipeta de vidrio.
- Figura 57. Un microelectrodo.
- Figura 58. Dos microelectrodos paralelos.
- 40 Figura 59. Dos microelectrodos en un pocillo de una placa de cultivo tisular.
- Figura 60. Una vista superior de un pocillo que contiene 3 células entre 2 microelectrodos.
- Figura 61. Una vista lateral del pocillo de la figura 60.
- Figura 62. Expresión de CD25 y sIgM sobre la superficie de células híbridas creadas mediante hibridación de una célula KBT y una célula B shIgM⁺CD25⁺ antes (A) y después (B) de la transfección estable con la segunda proteína hIL-2.
- 45

Descripción de la invención

[0142] Una realización preferida de la invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a las figuras adjuntas.

Ejemplo 1

1. Selección de células, manipulación de células y clonación de una célula individual

55 [0143] Los siguientes ejemplos describen preparaciones celulares que incluyen la selección y el aislamiento (o clasificación) de estirpes celulares de mamíferos y células primarias utilizadas para la creación de tri-híbridos de linaje cruzado, y para la expresión de proteínas deseadas. La elección de una técnica de selección particular para obtener una población pura de células con características específicas o el uso de un marcador (o marcadores) particular para el aislamiento de las células de un fenotipo particular no es de ninguna manera restrictiva sino más bien indicativa. Pueden usarse otros marcadores celulares o procedimientos de clasificación para entregar resultados similares.

60

1.1. Selección de células como fuente de oncogenes de estirpes celulares de mamífero

[0144] Todas las estirpes celulares inmortales (véase a continuación) se cultivaron en cultivo en suspensión en condiciones convencionales (normales) en una incubadora a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada usando RPMI1640 modificado (medio del Roswell Park Memorial Institute) con NaHCO₃ (JRH Biosciences), Hepes 20 mM (Sigma), L-glutamina 4 mM (Sigma) y complementado con suero de ternera fetal al 10 %, FCS, (JRH Biosciences). A menos que se indique lo contrario, el medio de cultivo tisular (medio TC) que se describe en el presente documento es el medio convencional para cultivar todas las estirpes celulares inmortales, células cancerosas primarias, cultivos celulares primarios y estirpes celulares tri-híbridas establecidas para la presente invención. En general, todas las estirpes celulares, células cancerosas primarias y células primarias utilizadas se cultivaron en un entorno sin antibióticos. Sin embargo, cuando existía la sospecha de un alto riesgo de contaminación bacteriana y/o fúngica, se incluyó una solución de penicilina al 2 % (5000 unidades)/estreptomycin (5 mg) (Sigma) en el medio convencional.

Estirpes celulares humanas

[0145] Las estirpes celulares humanas que pueden usarse en la presente invención son las siguientes: -

- a) Linaje progenitor mieloide común, K562 (una estirpe celular derivada de una leucemia mielógena crónica humana),
- b) Linaje linfóide T, MOLT4 (linfoblasto T humano), y
- c) Linaje linfóide B, WIL2NS (linfoblasto B humano).

Estirpe o estirpes celulares no humanas

[0146] Una estirpe celular no humana que puede usarse en la presente invención es una estirpe de células de mieloma de ratón-Sp2 (células plasmáticas de linfocitos B).

1.1.1. Sistema de entrega de una célula individual

[0147] El aislamiento o clasificación de células, la manipulación de células y la clonación de una célula individual son procesos esenciales a lo largo de la presente invención. En el presente documento los inventores describen un sistema de entrega de una célula individual que se estableció para manipular y/o clonar una célula individual de interés. El sistema de entrega de células (Figura 55) consiste principalmente en una micropipeta de vidrio, una jeringa de 1 ml y un manipulador grueso unidimensional. La Figura 56 muestra una micropipeta de vidrio en forma de L utilizada para recoger una célula individual de interés. La pipeta estaba hecha de un tubo capilar de hematocrito, de 75 milímetros (mm) de longitud, con un diámetro externo e interno de 1,5 mm y 1,10 mm, respectivamente. Mediante el uso de calor, se tiró de un extremo del tubo de manera que se obtuvo la punta (1) con un diámetro interno de aproximadamente 250-300 micrómetros (µm) y la pared de la punta de aproximadamente 30 µm de espesor. El otro extremo de la micropipeta permaneció sin modificar (2). En el sistema de entrega de células (Figura 55), una jeringa se monta en un manipulador grueso, que a su vez se monta en un soporte magnético (16). El sistema funciona de manera que el émbolo (6) de la jeringa pueda forzarse a moverse muy lentamente, ya sea hacia adelante o hacia atrás con respecto a la jeringa. Con el fin de manipular una célula individual de interés, la jeringa debe conectarse al extremo sin modificar de la micropipeta (2) como se muestra en la figura usando un tubo flexible de calidad médica (3). El sistema de entrega de una célula individual debe esterilizarse mediante el lavado abundante varias veces con alcohol al 70 % y, finalmente, rellenarse sin burbujas de aire con un medio o una solución de cultivo tisular adecuados, según sea necesario, antes de cualquier manipulación de células.

1.1.2. Clonación de una célula individual

[0148] Se establecieron clones de células de cada estirpe celular mediante clonación de una célula individual. A continuación, se describe una técnica de clonación o manipulación de una célula individual de cualesquier células biológicas, por ejemplo, células de la estirpe celular K562, utilizada en la presente invención.

[0149] Se extrajeron 5 µl de suspensión celular de células K562 de su cultivo en la fase logarítmica y se depositaron en un pocillo de una placa de 96 pocillos de cultivo tisular (placa TC, Becton y Dickinson o BD), que contenía 150 µl de medio TC. El pocillo se denominó "pocillo de almacenamiento de células". La placa se colocó en una platina de microscopio XY de un microscopio invertido (Axiovert 40C, Carl Zeiss). Antes del proceso de manipulación/clonación de una célula individual, una micropipeta (Figura 56) se llenó completamente con medio TC sin burbujas de aire. La micropipeta, el tubo y la jeringa del sistema de entrega de una célula individual (Figura 55) se montaron en un manipulador grueso unidimensional (Narishege). La punta de la micropipeta (1) se dispuso de manera que la punta estuviera ubicada en el centro de la vista óptica del microscopio. Para manipular y clonar una célula individual de K562, la micropipeta se insertó en el pocillo de almacenamiento de células. Moviendo el émbolo de la jeringa muy lentamente en la dirección de succión, se depositó una célula individual de K562 en la micropipeta. La micropipeta se retiró del pocillo de almacenamiento de células. Moviendo lateralmente la platina del microscopio desde el pocillo de almacenamiento de células a un pocillo adyacente, denominado "pocillo de clonación", e

insertando posteriormente la micropipeta en este pocillo de clonación, la célula individual en la micropipeta después se liberó suavemente de la micropipeta. Esto se consiguió moviendo el émbolo de la jeringa muy lentamente en una dirección de liberación. El proceso de extracción de una célula individual del pocillo de almacenamiento de células y la deposición de la célula individual en el pocillo de clonación se repitió varias veces hasta que se obtuvieron 60 clones de una célula individual por placa de TC. La placa de clonación se incubó en un incubador humidificado (Thermoline Scientific), que funcionaba a 37 °C con CO₂ al 5 % durante un período de 10 días. El medio en cada pocillo de clonación se repuso con medio TC recién preparado regularmente durante el período de incubación. Se registró la proliferación celular de cada clon de cada pocillo de clonación cada 24 horas. Al final del período de incubación, se estableció una serie de clones de células K562. Se seleccionó un clon con la velocidad de proliferación más alta o el nivel más alto de un marcador de interés que se expresaba sobre la superficie celular, por ejemplo, el receptor de transferrina CD71 sobre células K562, para la producción de tri-híbridos o experimentos adicionales.

1.1.3. Clasificación de células CD71⁺

15 **[0150]** Como ejemplo, el método a continuación describe una selección de células y la clasificación de células positivas para CD71 a partir de la estirpe celular K562 usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

20 **[0151]** Se incubaron 1x10⁵ células K562 suspendidas en 100 µl de una solución de tampón de fosfato (Dulbeco PBS) que contenía albúmina de suero bovino al 2 %, BSA, (Sigma) en la oscuridad con 20 µl de anti-CD71 conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) o anticuerpos de control isotípicos conjugados con PE IgG2a,κ (BD Pharmingen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de incubación se diluyó con 1 ml de PBS y las células teñidas se recogieron mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos. Después de un lavado adicional con 1 ml de PBS, las células teñidas se suspendieron en 1 ml de PBS y se analizaron inmediatamente usando un FACS (BD FACSCalibur). La Figura 1 muestra perfiles de células CD71⁺ de la estirpe celular K562. Las células positivas para CD71⁺ se seleccionaron y clasificaron (Figura 1a). Aproximadamente, el 65 % de la población de K562 original fue positiva para CD71. Las células clasificadas se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos y se suspendieron en 1 ml de PBS para experimentos adicionales. Se recogieron 100 ml de células clasificadas CD71⁺ suspendidas para el análisis de pureza, como se muestra en la Figura 1b. Se obtuvo una pureza del 99 % de las células clasificadas CD71⁺. Después de la clasificación de células, las células CD71⁺ de la estirpe celular K562 se usaron para experimentos adicionales o se colocaron en el cultivo en condiciones de cultivo convencionales y se marcaron como células K562 enriquecidas en CD71. La misma metodología se usó para establecer cultivos de WIL2NS enriquecidos con CD71 y de MOLT4 enriquecido con CD71.

1.1.3.1. Clasificación de células CD71⁺ de linaje mielomonocítico de cultivo de K562

40 **[0152]** Para garantizar el fenotipo mielomonocítico de las células para experimentos de hibridación celular, las células K562 CD71⁺ se enriquecieron adicionalmente para células CD15⁺ usando análisis por FACS seguido de clasificación.

45 **[0153]** Para este propósito, se marcaron células K562 enriquecidas con CD71 obtenidas a partir del proceso descrito en la Sección 1.1.3 con CD71 antihumano PE y CD15 antihumano FITC (BD Pharmingen). Se incubaron 1x10⁵ células K562 enriquecidas con CD71 lavadas suspendidas en 100 µl de PBS que contenía BSA al 2 % en la oscuridad con 20 µl de anticuerpos anti-CD71 humano-PE y anti-CD15 humano-FITC o anticuerpos de control isotípico negativos o anticuerpos de control isotípicos negativos marcados con PE y FITC durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de incubación se diluyó con 1 ml de PBS y las células teñidas se recogieron mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos. Después de un lavado adicional con 1 ml de PBS, las células teñidas se suspendieron en 1 ml de PBS y se analizaron inmediatamente usando un FACSCalibur (BD).

50 **[0154]** Se muestra un perfil típico de FACS en la Figura 2a. Después de 5 meses en el cultivo, el 99 % de las células K562 enriquecidas con CD71 permanecieron positivas para CD71, aproximadamente el 18 % expresaba CD15 de superficie. Las células positivas tanto para CD71 como para CD15 se seleccionaron (Figura 2a) y se clasificaron. Las células clasificadas se recogieron mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos y se suspendieron en 1 ml de PBS para experimentos adicionales. Se recogieron 100 µl de células clasificadas CD71⁺CD15⁺ suspendidas para un análisis de pureza. Después de dos meses de cultivo, las células clasificadas se volvieron a analizar para determinar la coexpresión de CD71 y CD15 (Figura 2 b). Los resultados indican que aproximadamente el 98 % de las células purificadas retuvieron tanto CD 71 como CD15. Se descubrió que algunas de las células que expresaban anteriormente tanto CD71 como CD15 sobre la superficie habían perdido su expresión de CD15 (Figura 2b), lo que sugiere que el compromiso con el linaje mielomonocítico en células K562 no es estable y reversible.

1.1.4. Selección de células positivas para el receptor de transferrina entre la estirpe celular Sp2 de ratón

65 **[0155]** Cuando se usó estirpe celular de mieloma de ratón Sp2 en la creación de tri-híbridos, la población se

enriqueció para células que expresaban receptor de transferrina de ratón (TfR), análoga de CD71 humano.

[0156] Esencialmente, se siguió el mismo protocolo que en la Sección 1.1.3, que describe el enriquecimiento de estirpes celulares humanas para células CD71⁺, excepto porque se usaron anticuerpos de rata anti-TfR de ratón conjugados con FITC (Abcam) en lugar de anticuerpo de ratón anti-CD71 humano conjugado con PE. Los controles de isotipo se ajustaron en consecuencia.

[0157] La Figura 44 muestra el perfil de las células TfR⁺ de la estirpe celular Sp2. Las células positivas para TfR⁺ se seleccionaron y se clasificaron (Figura 44a). Aproximadamente, el 45 % de la población original de Sp2 fue positiva para TfR. Las células clasificadas se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos y se suspendieron en 1 ml de PBS para experimentos adicionales. Se recogieron 100 ml de células seleccionadas TfR⁺ suspendidas para un análisis de pureza como se muestra en la Figura 44b. Se obtuvo una pureza del 99,5 % de células clasificadas TfR⁺. Después de la clasificación de células, las células TfR⁺ de la estirpe celular Sp2 se usaron para experimentos adicionales o se colocaron en el cultivo en condiciones de cultivo convencionales y se marcaron como células Sp2 enriquecidas con TfR.

1.2. Selección de células como fuente de oncogenes entre células cancerosas primarias

[0158] Como ejemplo, el método a continuación describe la selección de células transformadas del linaje mielógeno a partir de muestras de médula ósea obtenidas de pacientes con leucemia mielógena aguda (LMA). El mismo método también podría aplicarse para seleccionar células de otros linajes a partir de muestras de médula ósea de malignidades de sangre correspondientes.

[0159] Se obtuvieron aspirados de médula ósea de pacientes con LMA después del consentimiento informado. Las muestras se extrajeron de los pacientes cuyo diagnóstico de LMA se estableció antes de realizar los experimentos. Se aislaron células mononucleares de LMA usando el mismo procedimiento de centrifugación en gradiente de densidades que se describe en la Sección 1.3.1 y las células CD34⁺ de las muestras se clasificaron o aislaron usando un FACS.

[0160] Para teñir o marcar las células mononucleares obtenidas anteriormente, se añadieron 10 µl de un anticuerpo anti-CD34 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) o un anticuerpo de control de isotipo PE (BD Pharmingen) a 100 µl de una alícuota dada de 1x10⁶ células mononucleares en un medio de tinción (PBS + BSA al 5 %). Para una alícuota dada, la mezcla de tinción se incubó durante 30 minutos en hielo. Se añadieron 10 ml de medio de tinción enfriado con hielo al sedimento de células y se centrifugaron durante 7 minutos a 350 g y 4 °C. Los sobrenadantes se aspiraron y después el sedimento de células se resuspendieron moviendo el tubo en el que se añadió un volumen comparable de medio de tinción enfriado con hielo. Las células teñidas se centrifugaron y se lavaron una vez más en medio de tinción enfriado con hielo. Las células marcadas se suspendieron en medio de tinción y se aplicaron a FACS. Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas para la población de células CD34⁺, se recogieron las fracciones de células.

[0161] Para cultivos de enriquecimiento, se sembraron en placas 40x10³ células de las células enriquecidas con CD34⁺ en placas de 12 pocillos recubiertas previamente con matriz extracelular sintética. Las células se expandieron en medio TC completo complementado con 57 mM de β-mercaptoetanol (Sigma), hidrocortisona 1 mM y 20 ng/ml de IL-3 humana y G-CSF humano. Después de 48 horas en el cultivo, las células se seleccionaron adicionalmente para la expresión de CD15 usando FACS.

[0162] Para la tinción de células con fluorescencia, se usaron un antígeno anti-CD15 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen) y un anti-CD34 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) y también se empleó un método de tinción de células similar descrito anteriormente en esta Sección. Las muestras teñidas se analizaron usando un FACS. Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas para la población de células positivas para CD34 y CD15 (CD34⁺CD15⁺) o para la población de células positivas para CD34 y CD15 (CD34⁺CD15⁻), se recogieron las fracciones.

[0163] El perfil de expresión de CD15 sobre las células de LMA CD34⁺ después de 48 horas en cultivo se muestra en la Figura 3. Aproximadamente, el 54 % de las células mononucleares de LMA dieron positivo para CD15 mientras mantenían su expresión de CD34, mientras que el resto de la población celular mantuvo su expresión de CD34 sin comprometerse con el linaje mielomonocítico. Las células CD34⁺CD15⁺ se usaron en experimentos para crear tri-híbridos.

1.3. Células primarias

[0164] Las células primarias pueden derivar de cualquier tejido linfoide, tal como la sangre periférica, la sangre de cordón umbilical, el bazo, la médula ósea, el timo, las amígdalas y los ganglios linfáticos locales. Como primera etapa, todos los tejidos linfoides se procesaron para aislar células mononucleares.

1.3.1. Aislamiento de células mononucleares humanas a partir de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical

[0165] Se recogieron muestras de sangre periférica de individuos sanos después del consentimiento informado.

5 Cada muestra de sangre se recogió en tubos heparinizados (Vacutainer, BD), se agruparon y se diluyeron en RPMI1640.

[0166] Los aspirados de médula ósea humana se obtuvieron de pacientes que se sometieron a biopsias de médula ósea y tenían médula ósea normal sin anomalías en la sangre. Las muestras se diluyeron a una relación de

10 1:3 con RPMI1640.

[0167] Se obtuvieron muestras de sangre de cordón umbilical humano de partos vaginales normales a término, después del consentimiento informado. Cada sangre del cordón se recogió con una jeringa heparinizada de 60 ml después del parto y la ligadura del cordón antes de la expulsión de la placenta. Cada muestra se diluyó en

15 RPMI1640.

[0168] Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células mononucleares de médula ósea (BMMC) y células mononucleares de sangre de cordón umbilical (UCBMC) mediante centrifugación por densidad sobre Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia). En resumen, se colocaron en capas 10 ml de Ficoll-Paque

20 bajo 20 ml de suspensión celular usando un tubo de cánula unido a una jeringa de 20 ml. Las células de la muestra se centrifugaron a 1.700 rpm (700 g) durante 40 minutos a 4 °C. Las células en la interfaz se recogieron y se lavaron en 50 ml de RPMI1640 mediante centrifugación a 2.000 rpm (1.000 g) durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y las células sedimentadas se resuspendieron en 40 ml de RPMI1640 y se centrifugaron a 1.300 rpm (400 g) durante 10 minutos. Los eritrocitos y las plaquetas se retiraron mediante lisis con NH₄Cl al 0,83 % (peso/vol) y una

25 segunda centrifugación sobre Ficoll-Paque diluido a una relación de 1:2 con PBS, respectivamente.

[0169] Las células mononucleares aisladas se usaron para el cultivo o el análisis y la clasificación en fracciones específicas de célula a través de un FACS o un sistema de separación de perlas magnéticas.

30 1.3.2. Aislamiento de células mononucleares humanas a partir de tejidos linfoides sólidos

[0170] El método a continuación describe el procedimiento utilizado en la presente invención para aislar células mononucleares de bazo, timo, amígdala o ganglios linfáticos locales. También se proporciona un método para la tinción y clasificación de células.

35

[0171] Se obtuvieron muestras de bazo de donantes de trasplante de órganos siguiendo las directrices éticas nacionales. Se mantuvieron bloques de bazo, aproximadamente de 2 x 2 x 3 cm cada uno, a 4 °C en RPMI 1640 hasta el aislamiento de los esplenocitos. Cada bloque se cortó en trozos pequeños a través de la malla de un tamiz estéril usando el émbolo de una jeringa. Después, las células se disociaron enzimáticamente mediante digestión con

40 20 U/ml de colagenasa de tipo VII (Sigma) y 20 U/ml de DNasa (Sigma) en medio completo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los agregados celulares se disociaron adicionalmente mediante adición de EDTA para alcanzar 10 mM y agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, los esplenocitos se lavaron con medio completo dos veces para detectar la digestión enzimática y se resuspendieron en RPMI 1640. Estas condiciones no afectaron a la expresión de moléculas de superficie en comparación con procedimientos de

45 disociación no enzimáticos (McIlroy *et al.*, 1995). Se aislaron células mononucleares del bazo de estas suspensiones de esplenocitos mediante centrifugación en gradiente de densidades como se describe en la Sección 1.3.1, excepto por la retirada de eritrocitos. Las células mononucleares de bazo se resuspendieron en RPMI1640 y la concentración de células se ajustó a 1×10^6 células por ml. La viabilidad celular fue superior al 98 % según se determinó mediante exclusión con azul de tripano.

50

[0172] Se obtuvieron timos de niños sometidos a cirugía cardíaca después del consentimiento informado de sus padres. Los timocitos se aislaron de los timos mediante la ruptura del tejido del timo y la retirada por lavado abundante de los timocitos fuera del tejido con una jeringa llena de medio RPMI1640. Los timocitos se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidades como se ha descrito anteriormente.

55

[0173] Se obtuvieron amígdalas de pacientes sometidos a amigdalectomía por trastornos inflamatorios, después del consentimiento informado. Las muestras de tejido se almacenaron en hielo en medio completo y gentamicina 250 µg/ml y se procesaron en 3 horas. El tejido amigdalino se cortó en trozos después de retirar la capa epitelial y los bloques de tejido se aspiraron suavemente a través de una pipeta de transferencia cortada. Después, las células

60 amigdalinas se aislaron usando el mismo procedimiento descrito anteriormente en el aislamiento de células mononucleares esplénicas.

1.3.3. Aislamiento de células primarias específicas de linaje a partir de células mononucleares derivadas de diversos tejidos

5 [0174] Se aislaron células humanas de linaje linfocítico B, linaje linfocítico T y linaje mielocítico mediante procedimientos convencionales usando análisis por FACS y clasificación de células o clasificación magnética de células. A continuación, se proporcionan ejemplos no limitantes de tinción y clasificación de células para el aislamiento de células primarias específicas de linaje a partir de diversos tejidos.

10 1.3.3.1. Aislamiento de células B, linfocitos T auxiliares y células mielomonocíticas a partir de bazos y sangre periférica humanos

15 [0175] Las muestras de tejido se procesaron inicialmente para extraer una población de células mononucleares como se describe en la Sección 1.3.1. Después, se realizó una tinción de células por fluorescencia seguida de clasificación de células a las 4 horas del aislamiento de la población de células mononucleares. Las células se suspendieron en medio completo en condiciones de cultivo convencionales (véase la Sección 1.1) hasta la tinción.

1.3.3.1.1. Tinción celular y clasificación de células B maduras primarias, linfocitos T efectores y células mielomonocíticas derivadas de diversos tejidos

20 [0176] A continuación, se muestran ejemplos de tinción y clasificación de células B y linfocitos T a partir de células primarias. Por lo general, las selecciones de células B y linfocitos T auxiliares se basaron en las expresiones de superficie de CD19 y CD4, respectivamente, mientras que las selecciones de células mielomonocíticas se basaron en la expresión de superficie de CD14 y/o CD16.

25 [0177] En resumen, se añadieron 10 μ l de cada uno de entre anticuerpo anti-CD19 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD4 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) o control de isotipo apropiado, a una alícuota de 100 μ l de células mononucleares en medio de tinción (PBS + BSA al 5 %), que contenía 1×10^5 células por alícuota. Para una alícuota dada de población de células mononucleares, la mezcla de tinción se incubó durante 30 minutos en hielo. Se añadieron 10 ml de medio de tinción enfriado con hielo a la mezcla de tinción y se
30 centrifugaron durante 7 minutos a 350 g y 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y después se resuspendió el sedimento de células moviendo el tubo en el que se añadió un volumen comparable de medio de tinción enfriado con hielo. Las células teñidas se centrifugaron y se lavaron una vez más en medio de tinción enfriado con hielo. El proceso se repitió para otras alícuotas. Las células teñidas se analizaron usando un FACS. Se analizaron al menos 20.000 eventos seleccionados para cada muestra. Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas para la
35 población de células B positivas para CD19 ($CD19^+CD4^-$) o para la población de linfocitos T positivos para CD4 ($CD4^+CD19^-$), se recogieron las fracciones. Se recogió 1 ml de cada fracción para un análisis de pureza y el resto de cada fracción se resuspendió en medio completo para experimentos adicionales.

1.3.3.1.2. Recuperación y análisis de poblaciones de células clasificadas

40 [0178] Un pequeño número de células ($\leq 5 \times 10^5$ células) se clasificó directamente en tubos de microcentrífuga con adaptadores apropiados. Antes de la clasificación, se añadió un pequeño volumen (de 0,1 a 0,2 ml) de RPMI1640 complementado a los tubos de recuperación con el fin de mezclarse con la muestra clasificada y mejorar la viabilidad de las células clasificadas. Después de la clasificación, dado el número permitido de células recuperadas, se
45 diluyeron 20 μ l de cada muestra de células clasificadas a 1:10 con medio de tinción para un nuevo análisis para verificar su pureza. Una pureza aceptable fue del ≥ 95 %. Se añadieron de 20 a 40 μ l adicionales de FCS por ml de muestra clasificada y se siguió centrifugando durante 7 minutos a 350 g, 4 °C. Después, las células se resuspendieron en el medio de cultivo tisular convencional. Si había suficientes células disponibles, se contaron para determinar el rendimiento.

50 [0179] En la Figura 11a se muestra un perfil de FACS de muestras de bazo marcadas con anticuerpo anti-CD19 humano-FITC y anticuerpo anti-CD4 humano-PE, mientras que en las Figuras 11b y 11c se muestran los perfiles de análisis de pureza de células B $CD19^+$ y linfocitos T $CD4^+$ clasificados (ver la caracterización híbrida de KBT). La pureza celular en las fracciones superó el 98 % para las células $CD19^+$ y el 96 % para las células $CD4^+$.

55 [0180] Los perfiles de clasificación y pureza para las células $CD19^+$ y $CD4^+$ de sangre periférica fueron esencialmente similares a los de las muestras de bazo, solo que se obtuvo un número menor de cada población celular.

60 [0181] Para el aislamiento de monocitos humanos y células mielomonocíticas humanas, la población de células mononucleares se agotó en primer lugar de las células negativas para CD14 usando perlas magnéticas de CD14 humano, MACS (Miltenyi Biotec GmbH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD14 seleccionadas positivamente se teñieron o marcaron adicionalmente con anticuerpos anti-CD16 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) y anti-CD14 humano-PerCP de ratón (BD Pharmingen). Los métodos de tinción y clasificación de
65 células y la recuperación de células clasificadas se han descrito anteriormente (véase la Sección 1.3.3.1.1 y

1.3.3.1.2).

[0182] Las muestras teñidas se analizaron usando un FACS. Se analizaron al menos 20.000 eventos seleccionados. Aproximadamente el 86 % del total de células seleccionadas positivamente para CD14 usando perlas de MACS fueron positivas para CD14. La población de CD14⁺ se separó adicionalmente en tres grupos basándose en la expresión de CD16: CD14^HCD16⁻ que representa la mayor parte de las células CD14⁺; población minoritaria de células CD14^HCD16^L y CD14^HCD16^H. La pureza de las células en las fracciones superó el 98 % para CD14^HCD16⁻, el 96 % para CD14^HCD16^L y el 92 % para CD14^HCD16^H. Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas, se recogieron las siguientes poblaciones de células: fracciones de células CD14^HCD16⁻, CD14^HCD16^L y CD14^HCD16^H. La Figura 4 muestra un perfil de FACS de muestras enriquecidas con CD14 marcadas con anticuerpo anti-CD16 humano-PE de ratón y anticuerpo anti-CD14 humano-PerCP de ratón.

[0183] Los métodos de clasificación y purificación celulares de células CD14⁺ de tejidos del bazo fueron esencialmente los mismos que para los de muestras de sangre periférica, excepto porque se obtuvo un número menor de cada población celular.

1.3.3.2. Aislamiento de células B positivas para CD5 (con experiencia antigénica) y células B negativas para CD5 (indiferenciadas) a partir de sangre de cordón umbilical humana

[0184] Se prepararon células mononucleares a partir de muestras de sangre de cordón umbilical como se describe en la Sección 1.3.1. Se realizó una tinción de células por fluorescencia seguida de clasificación de células a las 4 horas del aislamiento de la población de células mononucleares. En este ejemplo particular, la clasificación de células B negativas para CD5 (indiferenciada) y células B positivas para CD5 (con experiencia antigénica) de sangre de cordón umbilical humana se realizó usando un anticuerpo anti-CD5 humano-FITC (BD Pharmingen), un anticuerpo anti-CD19 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) o control de isotipo apropiado de acuerdo con el método descrito anteriormente (Sección 1.3.3.1.1).

[0185] Las muestras teñidas se analizaron usando un FACS. Se analizaron al menos 20.000 eventos seleccionados para cada muestra. Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas para la población de células B negativas para CD5 (CD19⁺CD5⁻) o para la población de células B positivas para CD5 (CD19⁺CD5⁺), se recogió una serie de fracciones. La Figura 5 muestra un perfil típico de las muestras teñidas con anticuerpo anti-CD19 humano de ratón y anticuerpo anti-CD5 humano de ratón.

[0186] El porcentaje de células B en la muestra varió entre el 4 y el 19,2 % y las células B CD5⁺ variaron entre el 0,8 y el 7,2 % de los linfocitos circulantes totales.

1.3.3.3. Aislamiento de linfocitos T positivos para CD5 (con experiencia antigénica) y linfocitos T negativos para CD5 (indiferenciados) a partir de sangre de cordón umbilical humana

[0187] Se extrajeron células mononucleares de muestras de sangre de cordón umbilical usando un método similar al descrito en la Sección 1.3.1. La tinción de células por fluorescencia seguida de la clasificación de células se realizó a las 4 horas del aislamiento de la población de células mononucleares. En este ejemplo particular la clasificación de linfocitos T positivos para CD5 (con experiencia antigénica) y linfocitos T negativos para CD5 (indiferenciados) de sangre de cordón umbilical humana, se realizó usando un anticuerpo anti-CD5 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen), un anticuerpo anti-CD3 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) o control de isotipo apropiado de acuerdo con el método descrito anteriormente (Sección 1.3.3.1.1). Las células teñidas se analizaron usando un FACS. Se analizaron al menos 20.000 eventos seleccionados. Las ventanas de clasificación se configuraron para recoger fracciones que contenían linfocitos T negativos para CD5 (CD3⁺CD5⁻) o linfocitos T positivos para CD5 (CD3⁺CD5⁺). La Figura 6 muestra un perfil típico de las muestras teñidas con anticuerpos anti-CD3 humano de ratón y anticuerpos anti-CD5 humano de ratón.

Recuperación y análisis de poblaciones clasificadas

[0188] Efectivamente, el mismo método utilizado para recuperar y analizar las poblaciones clasificadas se ha descrito en la Sección 1.3.3.1.2.

[0189] El porcentaje de linfocitos T en las muestras varió del 1,7 al 13,5 % y los linfocitos T CD5⁺ variaron del 0,4 al 1,3 % del total de linfocitos circulantes.

1.3.3.4. Aislamiento de células B tempranas, células B activadas y en reposo basado en expresiones de CD 20 y CD 72 a partir de la población mononuclear de médula ósea humana

[0190] Se extrajeron células mononucleares de médula ósea usando el método descrito anteriormente (Sección 1.3.1). La tinción de células por fluorescencia seguida de la clasificación de células se realizó a las 4 horas del aislamiento de la población de células mononucleares. La tinción y la clasificación de las células B activadas se ha

descrito anteriormente en la Sección 1.3.3.1.1. Específicamente, se usaron 10 µl de un anticuerpo anti-CD72 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen) y 20 µl de un anticuerpo anti-CD20 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) o un control de isotipo apropiado (anticuerpos IgG2b,k de ratón PE). Las células teñidas se analizaron usando un FACS. Las ventanas de clasificación se configuraron para recoger fracciones que contenían una población positiva para CD20 que comprendía células pre-B, células B en reposo y activadas, células dendríticas foliculares (CD20⁺CD72⁻) o una población de células positivas para CD72 que comprendía células B tempranas (CD20⁻CD72⁺) o células B activadas (CD20⁺CD72⁺). La Figura 7 representa un perfil típico de las muestras teñidas con anticuerpos anti-CD20 humano de ratón y anti-CD72 humano de ratón.

10 Recuperación y análisis de poblaciones clasificadas

[0191] Efectivamente, se aplicó el mismo método que se ha descrito en la Sección 1.3.3.1.2 para recuperar y analizar células clasificadas.

- 15 **[0192]** Normalmente, aproximadamente el 10-15 % de la población de células mononucleares de médula ósea fue positiva tanto para CD20 como para CD72; el 9-12 % de las células fueron positivas para CD20, pero negativas para CD72; y aproximadamente el 8 % fueron positivas solamente para CD72.

1.3.3.5. Aislamiento de subpoblaciones de timocitos mediante clasificación con perlas magnéticas

20

- [0193]** Usando el kit MACS CD4 Multisort (Miltenyi Biotec GmbH), se clasificaron timocitos doble negativo CD4⁻CD8⁻, timocitos doble positivo CD4⁺CD8⁺ y poblaciones celulares de timocitos positivo simple CD4⁺ y CD8⁺ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron timocitos recogidos usando un método similar al descrito en la Sección 1.3.2 con microperlas de CD4 Multisort CD4 durante 30 minutos. Después de lavar con EDTA 5 mM y BSA al 0,5 % en PBS, las células marcadas se separaron en columnas magnéticas. Los timocitos seleccionados positivamente, que se retuvieron en la columna magnética, contenían poblaciones celulares positivo simple CD4⁺ y doble positivo CD4⁺CD8⁺, mientras que la población celular con CD4 agotado, que se eluyó a través de la columna, contenía células positivo simple CD8⁺ y doble negativo CD4⁻CD8⁻. Para retirar las microperlas de las poblaciones celulares seleccionadas positivamente para CD4, las células se incubaron con reactivo de liberación MACS Multisort. Después de 20 minutos, la digestión se detuvo y las células se marcaron durante 30 minutos con microperlas de CD8. Los timocitos doble positivo CD4⁺CD8⁺ se obtuvieron mediante selección positiva, mientras que se encontraron células positivas simple CD4⁺ en la población celular agotada. La población celular agotada en CD4 se incubó durante 30 minutos con microperlas de CD8. Después de aplicar células marcadas en una columna magnética, las células positivo simple CD8⁺ podrían separarse de los timocitos doble negativo CD4⁻CD8⁻. Las puridades de las cuatro subpoblaciones de timocitos diferentes se evaluaron mediante análisis por citometría de flujo. La pureza aceptada fue superior al 95 %.

1.3.3.6. Aislamiento de linfocitos T CD54⁺ a partir de amígdalas humanas

- 40 **[0194]** Se extrajeron células mononucleares de amígdalas humanas usando el método descrito en la Sección 1.3.2. La tinción de células por fluorescencia seguida de la clasificación de células se realizó a las 4 horas del aislamiento de la población de células mononucleares. Se extrajeron linfocitos T CD54⁺ (molécula de adhesión intercelular-1 o ICAM-1) de la población de células amigdalinas mononucleares, usando un anticuerpo anti-CD3 humano-PE de ratón (BD Pharmingen) y un anticuerpo anti-CD54 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen) o se eligió un control de isotipo adecuado usando el método de tinción/clasificación de células que se describe en la Sección 1.3.3.1.1. Las células teñidas se analizaron usando un FACS. Las ventanas de clasificación se configuraron para recoger fracciones que contenían linfocitos T CD3⁺ (es decir, células CD54⁺CD54⁺) o linfocitos T CD54⁺ activados (es decir, células CD3⁺CD54⁺). La figura 8 muestra un perfil de FACS de las muestras teñidas con anticuerpos anti-CD3 humano de ratón y anti-CD54 humano de ratón. Las células CD3⁺ se usaron para la creación de un tri-híbrido de linaje cruzado, mientras que se usaron linfocitos T activados CD54⁺ para experimentos de expresión.

- 45 **[0195]** Los resultados mostraron que mientras que los linfocitos T constituían la mayor parte (82 %) de las células mononucleares aisladas de amígdalas, solo el 9 % eran linfocitos T CD54⁺.

55

1.3.4. Aislamiento de células mononucleares de ratón

- [0196]** Se mantuvieron ratones BALB/c de 8-12 semanas de edad en las instalaciones para animales sin patógenos específicas. Antes de la extracción de tejido los ratones se sacrificaron mediante exposición CO₂. Se obtuvo sangre periférica mediante punción de la arteria axilar o femoral y se recogió en tubos recubiertos con heparina. El aislamiento de la población de células mononucleares se realizó usando el mismo protocolo que se ha descrito en la Sección 1.3.1 para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana. Se rompieron mecánicamente bazo de ratón y se aislaron células mononucleares usando un procedimiento para el aislamiento de células mononucleares esplénicas humanas como se ha descrito en la Sección 1.3.2.

65

1.3.5. Aislamiento de células primarias específicas de linaje a partir de células mononucleares de ratón

[0197] Se aislaron células de ratón de linaje linfocitario T y de linaje mielocítico mediante procedimientos convencionales usando análisis por FACS y clasificación de células o clasificación magnética de células. Se proporcionan a continuación ejemplos no limitantes de tinción celular y clasificación para el aislamiento de células de ratón primarias específicas de linaje.

1.3.5.1. Aislamiento de linfocitos T efectores a partir de bazo de ratón y sangre periférica

10 [0198] Las selecciones de diferentes linfocitos T efectores se basaron en las expresiones superficiales de CD4 y CD8.

[0199] Se añadieron 10 µl de cada uno de entre anticuerpo anti-CD4 de ratón-PE de ratón (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD8 de ratón-FITC de rata (BD Pharmingen) o control de isotipo apropiado a una alícuota de 100 µl de células mononucleares de bazo o sangre periférica en medio de tinción (PBS + BSA al 5 %), que contenían 1×10^5 células por alícuota. Para una alícuota dada de población de células mononucleares, la mezcla de tinción se incubó durante 30 minutos en hielo. Se añadieron 10 ml de medio de tinción enfriado con hielo a la mezcla de tinción y se centrifugaron durante 7 minutos a 350 g y 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y después se resuspendió el sedimento de células moviendo el tubo en el que se añadió un volumen comparable de medio de tinción enfriado con hielo. Las células teñidas se centrifugaron y se lavaron una vez más en medio de tinción enfriado con hielo. El proceso se repitió para otras alícuotas. Las células teñidas se analizaron usando un FACS. Se analizaron al menos 20.000 eventos seleccionados para cada muestra. Los perfiles de FACS típicos de tinción de sangre periférica de ratón y células mononucleares de bazo se muestran en la Figura 45 (a) y 45 (b), respectivamente. Ambos tejidos linfocitarios contenían linfocitos T CD4 o CD8 positivo simple y linfocitos T doble positivo, pero variaron en la representación celular. Por ejemplo, la mayor población en sangre periférica contenía linfocitos T citotóxicos CD8⁺CD4⁻ (43 %), mientras que las células mononucleares de bazo estaban representadas principalmente por linfocitos T auxiliares o reguladores CD4⁺CD8⁻ (42 %). Después de configurar las ventanas de clasificación apropiadas para la población positiva para CD4 (región R1), para la población positiva para CD8 (región R3) o la población de células doble positivo (región R2), se recogieron las fracciones. Se recogió 1 ml de cada fracción para el análisis de pureza y el resto de cada fracción se resuspendió en medio completo para experimentos adicionales. Las purezas para cada fracción fueron superiores al 98 %.

1.3.5.2. Aislamiento de monocitos a partir de sangre periférica de ratón

35 [0200] Se aislaron monocitos de ratón a partir de una población mononuclear de sangre periférica mediante el uso de selección negativa con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Las células mononucleares se suspendieron en tampón de clasificación magnética de células (PBS, BSA al 01 % peso/volumen y EDTA 0,5 mM) y se incubaron con una mezcla de MicroBeads de anticuerpo incluyendo anticuerpos contra linfocitos T (CD90), células B (B220) y linfocitos NK (CD49b) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, las células se hicieron pasar a través de una columna de selección negativa-LD. Se recogió la fracción negativa (monocitos). Para determinar la pureza, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con PE para CD11b y anticuerpos conjugados con FITC para CD90, B220, CD49b, NK1.1 y Ly6G (BD Pharmingen). Los monocitos se identificaron como CD11b⁺CD90⁻B220⁻CD49b⁻NK1.1⁻Ly6G^{-(bajo)} y el perfil de pureza se confirmó mediante FACS. El perfil de pureza de la población de monocitos de ratón se muestra en la Figura 46. El 100 % de las células fueron positivas para CD11b, mientras que más del 45 98 % de las mismas fueron negativas para B220, CD90, CD49b y NK1.1. Aproximadamente el 38 % de las células positivas para CD11b expresaron Ly6G a niveles bajos.

Ejemplo 2

50 2. Generación de células primarias que secretan proteínas deseadas

[0201] Los métodos utilizados para generar células humanas primarias que secretan proteínas deseadas se proporcionan en las siguientes Secciones. Estas células se usaron para experimentos de hibridación celular o como controles en experimentos analíticos o como referencia para el análisis de proteínas expresadas en un sistema de expresión tri-híbrido.

2.1. Generación de linfocitos que segregan GM-CSF humano

60 [0202] Se separaron linfocitos de sangre de cordón umbilical en primer lugar mediante centrifugación en gradiente de densidades como se ha descrito en la Sección 1.3.1 y después se activaron en cultivo con fitohemaglutinina (PHA) seguida de expansión celular en IL-2 (1000 U/ml). La producción de GM-CSF humano se analizó mediante ELISA. Las concentraciones de la producción variaron entre 15 y 40 ng/ml/ 10^6 células.

[0203] Se incubaron en la oscuridad un total de 300.000 linfocitos humanos activados por PHA con anticuerpo anti-CD4 humano de ratón conjugado con FITC (Sigma) a concentraciones de acuerdo con las instrucciones del

fabricante durante 30 minutos a 4 °C. Los linfocitos T humanos activados se analizaron y se seleccionaron usando un FACS (FACS VantageSE, BD). La Figura 42 (a) muestra un perfil típico de linfocitos T CD4⁺ en cultivos de linfocitos activados por PHA, donde la Figura 42 (b) muestra una pureza del 100 % para células clasificadas CD4⁺.

5 **2.2. Generación de linfocitos humanos que secretan IgM e IgG**

[0204] . Se sembraron células B purificadas (véase la Sección 1.3.3.1) a $3,75 \times 10^5$ células/ml en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning) recubiertas con anticuerpo anti-CD154 humano de ratón (BD Pharmingen). Las células se cultivaron en medio RPMI1640 completo complementado con FBS de IgG ultra baja inactivado por calor al 10 % (Gibco/BRL) e interleucina 4 (IL-4) 100 U/ml (R&D systems) e interleucina 10 (IL10) 50 ng/ml añadidas después del día 3 en el cultivo. Los cultivos se rellenaron reemplazando la mitad del medio de cultivo cada 2 a 3 días. La viabilidad celular y los recuentos se evaluaron por triplicado mediante exclusión con azul de tripano usando un hemocitómetro. El día 5 y el día 10, los linfocitos cultivados se recogieron, se lavaron dos veces en PBS y se analizaron mediante FACS usando anticuerpos anti-CD19 humano-PE de ratón, anti-IgM humano-FITC de ratón o anti-IgG humano-FITC de ratón (todos de BD Pharmingen). Todas las tinciones se consiguieron con 1 µg de cada anticuerpo por 1×10^6 células a 4 °C. En todos los análisis, más del 95 % de las células fueron doble negativo con marcadores configurados de acuerdo con la tinción de control negativo emparejado con isotipo. Las regiones que contenían células muertas y desechos se excluyeron del análisis. Todos los análisis se realizaron mediante selección de 5000 a 10000 células vivas.

[0205] Se muestran perfiles típicos de células positivas para IgM e IgG en los linfocitos cultivados en la Figura 9. Después de 5 días en el cultivo, el 18 % de las células CD19⁺ fueron positivas para IgM y solo el 1 % tenía IgG detectable sobre la superficie, mientras que después de 10 días el porcentaje de linfocitos positivos para IgM se redujo a solo el 2 %, mientras que el porcentaje de células positivas para IgG aumentó al 15 %. Después de configurar las ventanas apropiadas, se clasificaron fracciones positivas para IgM y positivas para IgG para experimentos de expresión de Ig.

[0206] Se determinaron concentraciones de IgM e IgG en el cultivo mediante un ELISA convencional usando placas de ELISA de 96 pocillos y anticuerpos purificados por afinidad con cabra y absorbidos en plástico frente a las cadenas µ y γ humanas. Los anticuerpos unidos se revelaron con anticuerpos anti-Ig humana de oveja conjugados con HRP. Todos los anticuerpos fueron de Sigma. Se usó ABTS como sustrato y las densidades ópticas se midieron a 405 nm. La Tabla 1 resume los niveles de IgM e IgG detectados en el cultivo de linfocitos B después de 5 y 10 días.

Tabla 1

Período en cultivo	IgM, ng/10 ⁶ células	IgG, ng/10 ⁶ células
5 días	2480 ± 182	850 ± 92
10 días	1215 ± 260	1914 ± 101

[0207] La producción de IgM disminuyó después de 5 días en el cultivo mientras que la producción de IgG aumentó.

40 **Ejemplo 3**

3. Hibridación de células somáticas

[0208] Se conocen bien en la técnica varios métodos de hibridación de células somáticas. Estos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un método biológico que usa virus fusagénicos tales como el virus Sendai (Kohler y Milstein, 1975), un medio químico que usa polietilenglicol (PEG) (Wojcieszyn, et al, 1983) y un método eléctrico que usa campos eléctricos (Neil y Zimmermann, 1993). Cada método puede inducir o provocar que las membranas plasmáticas de las células de interés sean permeables reversiblemente y se hibriden.

[0209] Independientemente de los métodos de hibridación celular mencionados anteriormente, se requieren dos etapas esenciales, en principio, para conseguir la hibridación celular. En primer lugar, las membranas plasmáticas de las células que se han de hibridar deben ponerse en contacto estrecho con la membrana celular. En segundo lugar, debe inducirse simultáneamente una ruptura reversible de las membranas plasmáticas en el punto de contacto.

[0210] Para el método de hibridación de células eléctricas, las células de interés pueden ponerse en contacto estrecho con la membrana celular usando un campo eléctrico de corriente alterna (campo de CA) con una frecuencia de campo apropiada y después pueden inducirse a hibridarse cuando se exponen a un pulso eléctrico corto simultáneamente con el campo de CA.

[0211] Para la elaboración adicional, la hibridación de células eléctricas implica los siguientes fenómenos físicos;

dielectroforesis (DEP) y una ruptura eléctrica de las membranas celulares plasmáticas.

[0212] La dielectroforesis (*Pohl, 1978*) es un fenómeno que describe el movimiento de partículas dieléctricas tales como células biológicas cuando se suspenden en una solución apropiada y se someten a un campo eléctrico de CA no uniforme de una frecuencia apropiada. Está bien documentado que el movimiento de las células puede describirse como una (i) traducción o migración de partículas dieléctricas, por ejemplo, a frecuencias de campo de entre 0,5 - 2,0 megahercios (MHz) para células Sp2 suspendidas en sorbitol 100 mM (*Mahaworasilpa, 1992*) y (ii) rotación de partículas dieléctricas (*Mahaworasilpa, 1992*), por ejemplo, a frecuencias de campo de entre 2 - 10 kilohercios (kHz) para células Sp2 suspendidas en sorbitol 100 mM. Puede generarse un campo no uniforme mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de un par de electrodos, por ejemplo, cables eléctricos, cilíndricos, que pueden disponerse en una serie de configuraciones. La configuración más utilizada es una configuración de electrodo paralelo (Figura 58). En presencia de un campo no uniforme, la DEP puede provocar que las partículas dieléctricas (es decir, las células biológicas) se atraigan entre sí y migren simultáneamente hacia las regiones del campo más intenso. Como resultado, forma una cadena o cuerda de células y, a su vez, induce un contacto estrecho de la membrana celular. Es evidente que la atracción mutua de las células se promueve fuertemente cuando las células se suspenden en soluciones de conductividad eléctrica moderadamente baja.

[0213] La ruptura eléctrica de las membranas celulares puede inducirse cuando las células suspendidas en una solución de hibridación adecuada se exponen a un pulso eléctrico con una amplitud y un ancho de pulso apropiados (*Zimmermann, 1982*). Se usa ampliamente un intervalo de anchos de pulso, por ejemplo, pulsos cuadrados de 1 a 200 microsegundos (μ s), dependiendo de los tipos celulares que se hibridan.

3.1. Sistema de hibridación de células eléctricas

[0214] En determinadas realizaciones de la presente invención, puede usarse una técnica de células eléctricas para crear células hibridadas, tales como los tri-híbridos.

3.1.1. Sistema de manipulación de células

[0215] Con el fin de manipular células individuales de interés antes de la hibridación celular, se usó el sistema de manipulación/entrega de una célula individual descrito anteriormente (Sección 1.1.1) en toda la presente invención.

3.1.2. Microelectrodos

[0216] En la presente invención se usaron dos microelectrodos en forma de L. La Figura 57 muestra un microelectrodo que estaba hecho de una aleación de níquel sin recubrir, de 128 μ m de diámetro (7). El eje del microelectrodo se cubrió con un tubo capilar de hematocrito, con un diámetro externo de 1,5 mm (8). La sección en forma de L del microelectrodo (9 y 10) se configuró para permitir que un área uniforme de la superficie de las secciones tanto horizontal como vertical del electrodo se exponga a un medio o una solución apropiada (*Mahaworasilpa, 1992*). Antes del proceso de hibridación celular, se montaron dos microelectrodos en dos micromanipuladores finos, uno por cada microelectrodo. Estos microelectrodos se dispusieron de manera que se obtuvo una configuración de electrodos en paralelo de cada electrodo (Figura 58). Cada micromanipulador fino se accionó hidráulicamente y permitió que se hiciera un movimiento tan fino como de 0,5 μ m en la dirección X, Y o Z.

3.1.3. Cámara y configuración de células

[0217] La Figura 59 muestra dos electrodos paralelos en un pocillo de una placa TC convencional de 96 pocillos, el pocillo sirve como una cámara de hibridación celular en determinadas realizaciones de la presente invención. Para realizar la hibridación celular, los microelectrodos se sumergieron en un medio apropiado (11) contenido en el pocillo (12) de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos convencional. La Figura 60 y la Figura 61 muestran una vista superior y una vista lateral de la configuración de electrodos en paralelo respectivamente, donde, por ejemplo, tres células preseleccionadas que se han de hibridar se colocan entre los electrodos paralelos de manera que puedan inducirse para que se alineen o formen una cadena de células en presencia de un campo eléctrico de CA apropiado.

55 Ejemplo 4

4. Ejemplos de producciones de tri-híbridos de linaje cruzado mediante un método eléctrico de hibridación de células

[0218] Las siguientes Secciones proporcionan ejemplos de la creación de estirpes celulares tri-híbridadas obtenidas mediante la hibridación de células de diferentes linajes o tipos celulares o de los mismos linajes o tipos celulares, pero de diferentes fenotipos. Cada tri-híbrido estable se sometió a un análisis para confirmar que poseía simultáneamente características fenotípicas de las células parentales. La confirmación se basó en el análisis de marcadores de superficie celular específicos de linaje, la expresión intracelular de marcadores específicos de linaje, la presencia de transcritos de ARN de marcadores específicos de linaje, el cariotipo y la secreción de proteínas

específicas de linaje. Los ejemplos a continuación ilustran las características fenotípicas más típicas de los tri-híbridos de linaje cruzado. Sin embargo, estos ejemplos no se limitan de ninguna manera a un marcador particular elegido.

5 4.1. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de tres células inmortales derivadas de linajes mieloide, linfoide T y B - *KMW*.

[0219] Este tipo de tri-híbrido de linaje cruzado se creó mediante la hibridación de una célula K562 mieloide, una célula MOLT4 linfoide T y una célula WIL2NS linfoide B. El tri-híbrido de linaje cruzado obtenido de este modo se marcó como una estirpe *KMW* (seguida de su número de serie). A continuación, se describen las siguientes etapas para el proceso de producción de tri-híbridos de linaje cruzado *KMW*, las soluciones (medios de hibridación, cultivo y recuperación) y los parámetros utilizados en la presente invención.

15 4.1.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado *KMW*

[0220] Se cultivaron las estirpes celulares K562, WIL2NS y MOLT4 en el medio convencional de los inventores (véase la Sección 1.1). Habitualmente, se hizo un pase de cada estirpe celular cada 3 días. Antes de la hibridación celular, el clon estable de cada tipo de célula que tenía la velocidad de proliferación más alta se estableció usando el procedimiento descrito en la Sección 1.1.2. En algunos experimentos, se usaron poblaciones de células enriquecidas con CD71⁺ establecidas como se ha descrito en la Sección 1.1.3. Además, en algunas ocasiones, se usaron las células CD15⁺ de la población K562 enriquecida con CD71⁺ (Sección 1.1.3.1).

20 4.1.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado *KMW*

[0221] Se usaron algunos pocillos de una placa TC de 96 pocillos como pocillos de hibridación celular. Cada pocillo se llenó con aproximadamente 150 µl de medio de hibridación, que consistía en sorbitol 240 mM (Sigma), KH₂PO₄ 2,0 mM (Sigma), CaCl₂ 0,4 mM (Sigma), Mg(C₂H₃O₂)₂ 0,2 mM (Sigma) y Ca(C₂H₃O₂)₂ 0,2 mM (Sigma), complementado con albúmina de suero bovino al 0,2 %, BSA (Sigma). Antes de la hibridación celular eléctrica, las células del clon preseleccionado de cada tipo celular se lavaron una vez en un medio de hibridación durante unos minutos y se transfirieron a un pocillo que contenía el medio de hibridación recién preparado. El pocillo se denominó un pocillo de prehibridación. Antes del proceso de hibridación celular, se manipuló una célula individual y lavada de cada clon seleccionado de acuerdo con la Sección 1.1.1, de manera que solo se colocaron tres células, una de cada clon seleccionado, entre un par de electrodos paralelos idénticos, que se sumergió en el fondo del pocillo (como se muestra en la Figura 61). La separación de los electrodos se configuró a 400 micrómetros (es decir, 400 µm).

35 Para conseguir la hibridación de células eléctricas, en primer lugar, se aplicó un campo de corriente alterna (CA) con una frecuencia de 0,8 MHz y una intensidad de campo de aproximadamente 50 - 60 kilovoltios por metro (por ejemplo, 50-60 kV/m) entre los electrodos durante unos segundos hasta que se indujeron las tres células para que se atrajeran entre sí por dielectroforesis, DEP y formar una cadena de células. Este proceso provocó que las células hicieran contacto estrecho con la membrana celular. Las células se dispusieron de manera que las células K562 estuvieran en el centro de la alineación de las células (véase la Figura 60 o 61). Después, se aplicaron dos pulsos cuadrados eléctricos, con un intervalo de 3 segundos entre los pulsos, simultáneamente con el campo de CA. Se usó cada pulso con una intensidad de aproximadamente 170 kV/m y un ancho de pulso de 75 microsegundos (por ejemplo, 75 µs). Después de completar el segundo pulso cuadrado, el campo de CA se mantuvo continuamente durante otros 5 segundos, lo que dio como resultado la hibridación celular en una única célula tri-híbrida de linaje

45 cruzado. Para determinadas realizaciones de la presente invención, se observó que la hibridación de las tres células podría no tener lugar simultáneamente, es decir, se producía en primer lugar la hibridación de dos de las tres células, seguida de la hibridación de la tercera célula. En algunos casos se requirió un pulso cuadrado adicional para obtener una hibridación completa de las tres células. La nueva célula tri-híbrida de linaje cruzado se transfirió después del pocillo de hibridación a un pocillo de recuperación, que se ubicó en una fila diferente de la de los pocillos de hibridación. Cada pocillo de recuperación contenía 150 µl de medio TC convencional (véase la Sección 1.1). Cada nueva célula tri-híbrida de linaje cruzado se incubó, una célula tri-híbrida de linaje cruzado por pocillo de recuperación, en una incubadora humidificada, que funcionaba a 37 °C y un contenido de CO₂ del 5 %, durante siete días. Se descubrió que la mayoría de los tri-híbridos de linaje cruzado se dividían en las 36 horas posteriores al evento de hibridación celular. Al final del período de incubación, el medio en cada pocillo de recuperación se rellenó

55 adecuadamente con medio convencional nuevo. Esto estimuló la proliferación celular de cada clon tri-híbrido de linaje cruzado. Dos o tres días después, se identificaron las células que se dividieron o sobrevivieron de cada pocillo de recuperación y se sembraron en placas en los pocillos de una placa TC convencional de 24 pocillos, dando origen a un conjunto de clones tri-híbridos de linaje cruzado. Cada clon de tri-híbrido de linaje cruzado se cultivó en la placa de 24 pocillos durante otra semana antes de transferirlo a un matraz de TC de 25 cm², que contenía 10

60 mililitros (ml) del medio de cultivo convencional de los inventores (véase la Sección 1.1) y se etiquetó adecuadamente para el análisis adicional. El proceso completo de hibridación celular eléctrica y el proceso de recuperación del tri-híbrido de linaje cruzado se repitió durante un número de veces para crear un lote de células tri-híbridadas de linaje cruzado estable.

4.3.1. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado KMW

Expresiones de marcadores CD

5 [0222] A continuación, se proporciona un ejemplo de la verificación de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado KMW establecida.

[0223] Después de configurar una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado KMW en condiciones de cultivo normales durante 6 meses, se analizó la expresión de marcadores CD específicos del linaje en la población de
10 células tri-híbridadas de linaje cruzado.

[0224] Se usó un análisis por FACS tricolor para verificar las coexpresiones de los siguientes marcadores CD: CD19 originado partir de WIL2NS, CD15 originado a partir de K562 y CD4 originado a partir de MOLT4.

15 [0225] En resumen, se suspendieron 100 μ l de células tri-híbridadas de linaje cruzado KMW a una concentración de 1×10^6 células/ml en PBS que contenía BSA al 5 % en 100 μ l de PBS y se incubaron durante 30 min a 4 °C con anticuerpo anti-CD15 humano-PerCP de ratón 0,5 mg/100 ml, anticuerpo anti-CD4 humano-PE de ratón 0,25 mg/100 ml y anticuerpo anti-CD19 humano-FITC de ratón 1,0 mg/100 ml o un control de isotipo adecuado. Todos los anticuerpos antihumanos de ratón se adquirieron de BD Pharmingen. Después de un lavado exhaustivo
20 con PBS, las células marcadas se analizaron usando el citómetro de flujo FACSCalibur y el software CellQuest Pro.

[0226] La Figura 10 muestra el perfil de FACS de la estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado KMW, lo que sugiere que las células tri-híbridadas de linaje cruzado KMW, en las que las características específicas del linaje provienen de fenotipos inmortales, contienen poblaciones celulares heterogéneas de fenotipos mixtos, siendo
25 predominante la mieloide. Sin embargo, el 62 % de las células KMW compartían fenotipos mieloides y linfoides y el 28 % de las células KMW expresan fenotipos linfoides T y B.

4.2. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de una célula mieloide inmortal y dos células linfoides primarias - KBT

30

[0227] El tri-híbrido de linaje cruzado se creó mediante hibridación de células somáticas de una célula K562 mieloide, una célula B humana primaria y un linfocito T humano primario. El tri-híbrido de linaje cruzado se denominó KBT seguido de un número de serie.

35 4.2.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KBT

[0228] La preparación de células K562 antes de la creación del tri-híbrido de KBT de linaje cruzado se ha descrito anteriormente (Sección 4.1.1). Las células primarias utilizadas en la creación de los tri-híbridos de linaje cruzado KBT incluyeron (i) células B maduras (CD19⁺) derivadas de bazo, sangre periférica o sangre de cordón umbilical;
40 células B tempranas (CD20⁺CD72⁺) derivadas de médula ósea; células B activadas (CD20⁺CD72⁺) derivadas de médula ósea; células B con experiencia antigénica (CD19⁺CD5⁺) derivadas de sangre de cordón umbilical y (ii) linfocitos T auxiliares (CD4⁺) derivados de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo, linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) derivadas de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo; linfocitos T con experiencia antigénica (CD3⁺CD5⁺) derivados de sangre de cordón umbilical; linfocitos T CD3⁺ de sangre de cordón
45 umbilical; en los experimentos se usaron linfocitos T doble negativo (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) derivados de timo, linfocitos T doble positivo (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) derivados de timo. El aislamiento de diversas células linfoides primarias de diversos tejidos linfoides se ha descrito anteriormente en la Sección 1.3.

4.2.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbrido de linaje cruzado de KBT

50

[0229] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbrido de linaje cruzado de KBT es similar al utilizado para la producción de tri-híbrido de linaje cruzado de KMW (Sección 4.1.2), excepto porque el medio y los campos eléctricos de CA y los pulsos variaron. El medio de hibridación utilizado en estos experimentos consistía en sorbitol 230 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, CaCl₂ 0,5 mM, Mg(C₂H₃O₂)₂ 0,2 mM y Ca(C₂H₃O₂)₂ 0,3 mM, complementado con
55 BSA al 0,3 %. Se aplicó un campo de CA de 0,5 MHz y 65-75 kV/m simultáneamente con un tren de tres pulsos cuadrados en un intervalo de 3 segundos, cada uno con un ancho de pulso de 100 μ s y una fuerza de 175-185 kV/m. El campo de CA se encendió de forma continua durante otros 5 segundos después de completar el tercer pulso cuadrado, lo que dio como resultado la hibridación de las células para producir una célula tri-híbrida de linaje cruzado. Los protocolos para la recuperación y el establecimiento de una estirpe estable de esta célula tri-híbrida de
60 linaje cruzado formada recientemente se describieron en la Sección 4.1.2.

4.2.3. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado de KBT

Expresiones de marcadores CD sobre la superficie celular

5 Una estirpe celular de tri-híbrido de linaje cruzado de KBT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562), una célula B madura primaria y un linfocito T auxiliar efector primario

[0230] Después que se había establecido una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado, por ejemplo, en condiciones normales de cultivo durante unos pocos meses, la estirpe celular se analizó para determinar la expresión de marcadores CD específicos de linaje. Las células de la estirpe celular KBT se marcaron con anticuerpos anti-CD19 y CD4 humanos usando los mismos protocolos que se describen en la preparación celular antes de la hibridación (Sección 1.3.1.1). La Figura 11 (d) muestra los perfiles de FACS (marcadores CD19 y CD4) de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KBT establecida a partir de una célula mielomonocítica inmortal y 2 células primarias. Normalmente, más del 95 % de las células en un tri-híbrido de linaje cruzado estable de este tipo expresaron marcadores CD tanto para las células B como para los linfocitos T con una densidad similar a la de las células primarias parentales.

Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KBT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562) y 2 células linfoides con experiencia antigénica primarias (linfocitos B y T)

[0231] En otra realización, se estableció una estirpe celular KBT derivada de la hibridación celular de una célula K562, una célula B con experiencia antigénica y un linfocito T con experiencia antigénica. Las células se analizaron para la coexpresión de CD19, CD3 y CD5 usando un FACS.

[0232] En resumen, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD5 humano-FITC de ratón y anti-CD19 humano-PE de ratón o anti-CD4 humano-PE de ratón usando los mismos protocolos que en la preparación celular antes de la hibridación celular (Sección 1.3.1.1). La Figura 12 muestra los perfiles de FACS de las células de dicha estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KBT. Los resultados muestran que el 5-10 % de la población de células KBT conservó su memoria de exposición al antígeno manteniendo la expresión de la molécula CD5 en la superficie celular, mientras que era positiva para CD3 y/o CD19. Además, al menos el 83 % de la población de células CD5 negativas coexpresaron los marcadores tanto del linaje B (CD19) como del linaje T (CD3).

Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KBT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562), una célula B activada y un linfocito T efector no comprometido doble positivo primario

[0233] En otra realización, se estableció una estirpe celular KBT derivada de la hibridación celular de una K562, un linfocito T (doble positivo para CD4⁺ y CD8⁺) aislado de timo y una célula B activada (CD20⁺ y CD72⁺) (explicada en la sección 1.3.34) aislada de médula ósea. Las células se analizaron para determinar las coexpresiones de CD4, CD8, CD20 y CD72 sobre la superficie celular.

[0234] En resumen, las células tri-híbridas de linaje cruzado de KBT se marcaron con una combinación de anticuerpos anti-CD4 humano-PE de ratón y anticuerpos anti-CD72 humano-FITC de ratón o anticuerpos anti-CD20 humano-PE de ratón y anticuerpos anti-CD8 humano-FITC de ratón o anticuerpos anti-CD4 humano-PE de ratón y anti-CD8 humano-FITC de ratón usando el mismo protocolo descrito para el aislamiento de linfocitos primarios (Sección 1.3.3.1.1). La Figura 13 muestra los perfiles de FACS de dichas células tri-híbridas de linaje cruzado.

[0235] Los resultados (véase la Figura 13) mostraron que el 99 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado de KBT expresaban CD4 o CD8 derivados de linfocitos T doble positivo sobre su superficie donde el 66-71 % de las células fueron positivas para CD4 y un 88-89 % de las células fueron positivas para CD8. En el 60 % de estas células, la expresión de CD4 y CD8 fue simultánea. Aunque fueron positivas para CD4 derivado de timocitos doble positivo, el 61 % de las células también fueron positivas para CD72 derivado de células B activadas de médula ósea. Sin embargo, el 94 % de la población de tri-híbridos de linaje cruzado expresó CD72 en su superficie. Por otro lado, el 31 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado positivas para CD8 coexpresaron CD20. El número total de células CD20 positivas fue del 39 %.

4.3. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de un linfoide inmortal, una célula linfoide primaria y una célula mielomonocítica primaria -WTM

[0236] Este es un ejemplo de creación de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado a partir de una célula linfoide B humana inmortal (WIL2NS), un linfocito T humano primario y un monocito humano primario. La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado se marcó como WTM seguido de un número de serie.

4.3.2. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM

[0237] La preparación de células WIL2NS utilizadas en la creación de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM se ha

descrito anteriormente en la Sección 4.1.1. Las células primarias incluyen monocitos CD14⁺CD16⁻ o CD14⁺CD16⁺ derivados de bazo y sangre periférica; se usaron en estos experimentos linfocitos T auxiliares (CD4⁺) derivados de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo; linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) derivados de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo; linfocitos T con experiencia antigénica (CD3⁺CD5⁺) y T CD3⁺ derivados de sangre de cordón umbilical; linfocitos T doble negativo (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) y linfocitos T doble positivo (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) derivados de timo. El aislamiento de diversas células linfoides primarias de diversos tejidos linfoides se ha descrito anteriormente (Sección 1.3.3). En determinadas realizaciones, se usaron células progenitoras mielomonocíticas CD34⁺CD15⁺ derivadas de médula ósea en lugar de monocitos positivos para CD14.

10 4.3.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM

[0238] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM fue similar al utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KMW (véase la Sección 4.1.2), excepto porque el medio varió. El medio de hibridación utilizado en estos experimentos consistió en sorbitol 235 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, CaCl₂ 0,5 mM, Mg(C₂H₃O₂)₂ 0,3 mM y Ca(C₂H₃O₂)₂ 0,25 mM (Sigma), complementado con BSA al 0,3 %. El protocolo eléctrico exacto que se ha descrito en la Sección 4.2.2 se usó para la producción de WTM. Los protocolos para la recuperación y el establecimiento de una estirpe estable de esta célula tri-híbrida de linaje cruzado recién formada se describieron en la Sección 4.1.2.

20 4.3.2. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM

Expresiones de marcadores CD

25 **Una estirpe celular de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM establecida a partir de una célula linfoide inmortal (WIL2NS), un linfocito T primario y un monocito primario**

[0239] Se estableció una estirpe celular WTM derivada de la hibridación celular de una célula WIL2NS, un linfocito T primario y un monocito. Después de que la estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado se hubiera cultivado en condiciones normales (véase la Sección 1.1) durante 6 meses, la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado se analizó para determinar la expresión de marcadores CD específicos de linaje. El análisis por FACS tricolor se usó para verificar la coexpresión de CD19 originado a partir de WIL2NS, CD14 originado a partir de monocitos primarios y CD4 originado a partir de linfocitos T primarios cuando estos linfocitos T primarios se usaron para la hibridación.

[0240] En resumen, se incubaron 100 ml de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de WTM a una concentración de 1x10⁶ células/ml en PBS que contenía BSA al 5 % suspendidas en 100 µl de PBS durante 30 min a 4 °C con anticuerpos monoclonales marcados (CD14-PerCP 0,5 mg/100 ml, CD4-PE 0,25 mg/100 ml y CD19-FITC 1,0 mg/100 ml, todos adquiridos de BD Pharmingen) o el control de isotipo adecuado. Después de un lavado exhaustivo con PBS, las células marcadas se analizaron usando el citómetro de flujo FACSCalibur y el software CellQuest Pro.

[0241] En la Figura 14 se muestran perfiles de FACS de células tri-híbridadas de linaje cruzado de WTM. Aunque los niveles de la expresión CD19, marcador derivado de células inmortales, parecían ser uniformes entre la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado, las expresiones de marcadores que se originaban a partir de células primarias parecieron variar. En este ejemplo particular, las poblaciones de células pueden dividirse en los tres subgrupos basándose en la intensidad de las expresiones de CD14 y CD4: (i) CD4^HCD14^L; (ii) CD4^HCD14^H; (iii) CD4^LCD14^H. Cada una de estas poblaciones puede aislarse posteriormente mediante técnicas convencionales tales como FACS, MACS o clonación de una célula individual, etc. y pueden expandirse en cultivos tri-híbridos de linaje cruzado separados procesando características fenotípicas diferentes entre sí, mientras se mantiene la homogeneidad en cultivo.

50 **Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM establecida a partir de una célula linfoide inmortal (WIL2NS), un linfocito T con experiencia antigénica primario y un monocito primario.**

[0242] Cuando se usaron linfocitos T con experiencia con antígeno CD5⁺ para generar una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM, la expresión de CD5 simultáneamente con CD19 y CD14 se verificó mediante el uso de un análisis por FACS tricolor. El protocolo fue esencialmente el mismo que se ha descrito anteriormente, excepto porque se emplearon anticuerpos anti-CD19 humano-PE de ratón y anti-CD5 humano-FITC de ratón en lugar de anticuerpos anti-CD19 humano-FITC de ratón y anticuerpos anti-CD4 humano-PE de ratón. Se muestran perfiles de FACS de estas expresiones de CD en las células tri-híbridadas de linaje cruzado en la Figura 15. El análisis demostró que, aunque el nivel de expresión de CD19 derivado de células inmortales y responsable del fenotipo de células B parece ser uniforme, de aproximadamente el 91-99 % de la población celular, la expresión de CD5 derivado de linfocitos T con experiencia antigénica y CD14 derivado de monocitos primarios varió entre las células híbridadas de WMT. Solo el 63 % de las células positivas para CD19 también fueron positivas para CD5 y el 79 % de las células positivas para CD19 fueron positivas para CD14. Notablemente, el nivel de expresión de CD14 varió entre dichas células tri-híbridadas de linaje cruzado de WMT de bajo a alto. Por otro lado, la población celular se dividió

claramente en las células tri-híbridas de linaje cruzado de CD5⁺ y CD5.

Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM establecida a partir de una célula linfoide inmortal (WIL2NS), un linfocito T citotóxico primario y un monocito primario.

5

[0243] Cuando se usaron linfocitos T positivos para CD8 citotóxicos para crear una estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de WTM, el análisis por FACS se realizó para verificar la coexpresión de CD19, CD8 y CD14 usando el mismo protocolo de etiquetado tricolor como se ha descrito anteriormente en la presente Sección. La Figura 16 muestra los perfiles de FACS de las expresiones de CD19, CD8 y CD14 sobre las células de la presente estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM. La expresión de CD19 y su nivel se mantuvieron constantes entre estas células tri-híbridas de linaje cruzado de WMT, mientras que solo el 46 % de estas células coexpresaron CD8 derivado de linfocitos T citotóxicos primarios a niveles bajos y el 41 % coexpresaron CD14 derivado de monocitos primarios. Notablemente, el nivel de expresión de CD14 entre estas células de WMT varió de bajo a alto.

15 Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM de una célula linfoide inmortal (WIL2NS), un linfocito T doble positivo primario y un monocito primario

[0244] Cuando se usaron linfocitos T positivos para CD dobles (CD4⁺CD8⁺) derivados de timos para la creación de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM, se utilizó el análisis de la coexpresión de CD4 y CD8 además del análisis de las expresiones de CD19, CD8 y CD14. La Figura 17 muestra un perfil de FACS para la coexpresión de CD4 y CD8 sobre las células de la estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado. En este caso donde se usaron linfocitos T doble positivo, el 96 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado de WTM fueron positivas tanto para CD4 como para CD8. El perfil de expresión de CD19 y CD14 en las células tri-híbridas de linaje cruzado de WTM derivadas de linfocitos T positivos para CD4⁺CD8⁺ fue esencialmente similar al de las células tri-híbridas de linaje cruzado de WTM derivadas de linfocitos T efectores positivos para CD8 citotóxico.

Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WTM establecida a partir de una célula linfoide inmortal (WIL2NS), un linfocito T primario y una célula progenitora mielomonocítica primaria

[0245] Cuando se usaron células mielomonocíticas CD34⁺CD15⁺ derivadas de médula ósea para generar una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado WTM, se analizaron los marcadores de superficie para CD19 (linaje B), CD3 (linaje T), CD15 (linaje mieloides) y CD34 (células progenitoras). En resumen, las células de la presente estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado WMT se marcaron con una combinación de anticuerpos anti-CD19 humano-PE de ratón, anti-CD4 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen) y anti-CD15 humano-PerCP de ratón o con una combinación de anticuerpos anti-CD34 humano-PE de ratón, anti-CD4 humano-FITC de ratón y anti-CD15 humano-PerCP de ratón. La tinción celular se realizó de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (Sección 1.3.3.1.1.). Los perfiles de expresión típicos de células tri-híbridas de linaje cruzado de WTM que se originan a partir de células progenitoras mielomonocíticas CD34⁺CD15⁺ se muestran en la Figura 18. El análisis mostró que aproximadamente el 81 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado de WTM compartieron el linaje B y fenotipos mielomonocíticos (CD19⁺CD15⁺) y el 61 % de CD19⁺ también fue positivo para CD4, el marcador de linaje T. El 34 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado CD4⁺ conservaron también CD34 sobre su superficie y el 68 % de las CD34⁺ células tri-híbridas expresaron CD15. Curiosamente, el 28 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado CD34⁺ no conservó la expresión de CD15 incluso a pesar de que tanto CD34 como CD15 proceden de la misma fuente (célula progenitora mielomonocítica).

45

4.4. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de una célula mieloides inmortal, una célula linfoide inmortal y un linfocito T linfoide primario. - KWT

[0246] Este tipo de producción de tri-híbridos de linaje cruzado se creó mediante la hibridación celular de una célula mieloides inmortal (K562), una célula linfoide B inmortal (WIL2NS) y un linfocito T humano primario. El tri-híbrido de linaje cruzado de este tipo se denominó KWT seguido de un número de serie.

4.4.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT

[0247] Las preparaciones de células K562 y WIL2NS para estos experimentos de hibridación de células se han descrito en las Secciones 4.1.1. Antes de la hibridación celular, se estableció un clon estable de cada tipo de célula, que presentaba la velocidad de proliferación más alta, usando el procedimiento descrito en la Sección 1.1.1. En determinadas realizaciones, se usaron poblaciones de células enriquecidas con CD71⁺ como se ha descrito en la Sección 1.1.3. En realizaciones adicionales, se usaron células CD15⁺ de la población de K562 enriquecida en CD71⁺ seleccionada como se ha descrito en la Sección 1.1.3.1. Las células primarias utilizadas para la creación de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT incluyeron linfocitos T auxiliares (CD4⁺) derivados de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo; linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) derivados de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y timo; linfocitos T con experiencia antigénica (CD3⁺CD5⁺) y linfocitos T CD3⁺ derivados de sangre de cordón umbilical; se usaron linfocitos T doble negativo (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) y linfocitos T doble positivo (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) derivados de timo en estos experimentos (véase la Sección 1.3).

65

4.4.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbrido de linaje cruzado de KWT

[0248] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT fue similar al utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KMW (véase la Sección 4.1.2).

5

4.4.3. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT

Expresión de marcadores CD

10 Una estirpe celular de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562), una célula linfóide inmortal (WIL2NS) y un linfocito T primario

[0249] Se estableció una estirpe celular derivada de KWT a partir de la hibridación celular de una célula K562, una célula WIL2NS y un linfocito T primario. Después de que la estirpe celular de tri-híbrido de linaje cruzado se hubiera mantenido estable en condiciones de cultivo normales durante 6 meses, se analizó la expresión de marcadores CD específicos de linaje en la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado. Se usó un análisis por FACS tricolor para identificar la coexpresión de CD15 que se origina a partir de K562, CD19 que se origina a partir de WIL2NS y CD4 que se origina a partir de linfocitos T auxiliares efectores primarios. El protocolo para la tinción celular de células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT fue esencialmente el mismo que el descrito para los tri-híbridos de linaje cruzado de KMW (Sección 4.1.3). Los perfiles de FACS de células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT derivadas de linfocitos T efectores CD4⁺ se muestran en la Figura 19. La mayoría de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT mostraron características fenotípicas mixtas de linajes linfoides mielomocíticos, B y T. El 100 % de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT expresaron CD4 en la superficie celular, un marcador del linaje linfóide T, que deriva del linfocito T efector primario, mientras que el 54 % de estas células fueron simultáneamente positivas para el marcador CD19 del linaje B derivado de células inmortales de la estirpe WIL2NS y el 24 % de estas células CD4⁺CD19⁺ fueron positivas para CD15 derivado de la estirpe de células progenitoras mielomonocíticas inmortales K562.

30 Una estirpe celular de tri-híbrida de linaje cruzado de KWT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562), célula linfóide inmortal (WIL2NS) y un linfocito T doble positivo

[0250] Cuando se usaron linfocitos T doble positivo (células CD4⁺CD8⁺) para generar una estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de KWT, también se analizó el perfil de expresión de CD4 y CD8 derivados de timocitos primarios. El protocolo para el realizar el perfil de CD fue esencialmente el mismo que se ha descrito anteriormente para los tri-híbridos de linaje cruzado de KWT derivados de linfocitos T CD4⁺, excepto porque se usó anticuerpo anti-CD8 humano-FITC de ratón en lugar de anticuerpo anti-CD19 humano-FITC de ratón. Los perfiles de expresión de CD típicos de las células tri-híbridadas de linaje cruzado derivadas de los linfocitos T doble positivo (CD4⁺CD8⁺) se muestran en la Figura 20. Los resultados mostraron que el 99 % de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT fueron positivas para CD4⁺ y el 69 % fueron positivas para CD8, con un 26 % de las células CD4⁺ que son positivas para el marcador de células mielomonocíticas CD15 y el 23 % de las células CD8⁺ que son positivas para CD15, lo que significa que las células CD4⁺CD8⁺CD15⁺ representaron aproximadamente el 23 % de la población celular total (debido a que casi el 100 % de las células son CD4⁺, la población de CD8⁺CD15⁺ doble positivo también sería positiva para CD4). Al igual que en los tri-híbridos de KWT derivados de linfocitos T efectores CD4⁺, las células CD19⁺ representaron el 52 % de la población celular total, expresando el 22 % de las mismas CD15. Por tanto, toda la población de células CD15⁺ coexpresó CD4, CD8 y CD19, lo que significa un 22-23 %.

Una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KWT establecida a partir de una célula mielóide inmortal (K562), una célula linfóide inmortal (WIL2NS) y un linfocito T con experiencia con antígeno CD5 positivo

[0251] Cuando se usaron linfocitos T con experiencia con antígeno CD5 positivo para generar una estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de KWT, se analizó la expresión de CD5. Las células híbridadas de KWT se marcaron con anticuerpos anti-CD19 humano-FITC de ratón y anti-CD5 humano-PE de ratón usando el mismo protocolo que se usó para el análisis de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM excepto por la reversión de conjugados fluorescentes entre anticuerpos anti-CD19 humano de ratón y anti-CD5 humano de ratón (Sección 4.6). Los resultados que se muestran en la Figura 21 demostraron que el 90 % de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT fueron positivas para CD5 que se origina a partir de linfocitos T con experiencia antigénica y el 49 % de las células CD5 también fueron positivas para CD19 que se origina a partir de células WIL2NS (células B). El porcentaje total de células CD19⁺ entre las células tri-híbridadas de linaje cruzado fue de aproximadamente el 56 %.

60 4.5. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de dos células linfoides inmortales (WIL2NS) y un monocito primario - WWM

[0252] Este tipo de producción de híbridos de linaje cruzado se creó mediante la hibridación de células somáticas de dos células linfoides inmortales (WIL2NS) y un monocito humano primario. El tri-híbrido de linaje cruzado se marcó como WWM seguido de un número de serie.

65

4.5.1. Preparación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WWM

[0253] La estirpe celular WIL2NS se cultivó en el mismo procedimiento que se ha descrito en la Sección 4.1.1.

5 [0254] En determinadas realizaciones, se usaron poblaciones de células enriquecidas con CD71⁺ establecidas como se ha descrito en la Sección 1.1.3. Se aislaron monocitos humanos a partir de linfocitos mixtos procedentes de bazo, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. El aislamiento de monocitos se basó en la expresión de marcador CD14 y, en algunos casos, niveles bajos de expresión de CD16, ya sea FACS o perlas magnéticas, como se ha descrito anteriormente en la Sección 1.3.3.1.1. Parece que no existen diferencias en los parámetros de
10 hibridación o en los tri-híbridos de linaje cruzado resultantes cuando se usaron monocitos de diferentes tejidos linfoides.

4.5.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WWM

15 [0255] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WWM fue similar al utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de KBT (véase la Sección 4.2.2).

4.5.3. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado de WWM

20 Expresión de marcadores CD

[0256] Después de que una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de WWT haya sido estable en condiciones de cultivo normales (véase la Sección 1.1) durante 6 meses, se analizó la población de células tri-híbridas de linaje cruzado para la expresión de marcadores CD específicos del linaje.

25 [0257] La tinción o el marcaje doble con anticuerpos anti-CD19 humano-FITC de ratón y anti-CD14 humano-PE de ratón se aplicó para perfilar la expresión del marcador de linaje cruzado del tri-híbrido de linaje cruzado resultante. La Figura 22a muestra un perfil de CD típico de dichas células tri-híbridas de linaje cruzado. La expresión del marcador CD19 ligado a oncogén parecía ser constante en las células tri-híbridas de linaje cruzado. Mientras que
30 determinada proporción de las células (23,5 %) expresó CD14 sobre su superficie, el 72,7 % restante fue negativo para la expresión en superficie de CD14.

4.6. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado usando células de mamíferos no humanos

35 [0258] El siguiente ejemplo indica que pueden crearse tri-híbridos de linajes cruzado usando células de mamíferos distintas de células humanas, específicamente células de ratón. Se entiende que puede aplicarse el mismo principio para generar tri-híbridos de linaje cruzado a partir de otras células de mamíferos.

4.6.1. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de una célula linfocítica de ratón inmortal, una célula linfocítica de ratón primaria y un monocito de ratón primario.

40 [0259] Esta sección describe la creación de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado a partir de una célula linfocítica B de ratón inmortal (Sp2), un linfocito T de ratón primario y un monocito de ratón primario. La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado se marcó como STmMm seguido de un número de serie.

4.6.1.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm

[0260] La preparación de células Sp2 utilizada en la creación de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm se ha descrito anteriormente en la Sección 1.1.4. Las células primarias de ratón que incluyen monocitos CD11b⁺CD90⁻
50 B220⁻CD49b⁻NK1.1⁻Ly6G^{-bajo} derivados de sangre periférica; linfocitos T auxiliares de ratón (CD4⁺) derivados de bazo o sangre periférica; linfocitos T citotóxicos de ratón (CD8⁺) derivadas de bazo o sangre periférica; y linfocitos T doble positivo (CD4⁺CD8⁺) derivados de bazo o sangre periférica se usaron en estos experimentos. El aislamiento de diversas células linfocíticas primarias de ratón de bazo y sangre periférica se ha descrito anteriormente (Sección 1.3.5).

4.6.1.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm

[0261] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm fue similar al utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de WTM (véase la Sección 4.3.2), excepto
60 porque el medio y los campos y pulsos eléctricos de CA variaron. Es decir, el medio de hibridación utilizado en estos experimentos consistió en sorbitol 265 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 0,4 mM y Mg(C₂H₃O₂)₂ 0,3 mM (Sigma), complementado con BSA al 0,2 %. Se aplicó un campo de CA de 0,5 MHz y 65-75 kV/m simultáneamente con un tren de tres pulsos cuadrados en un intervalo de 3 segundos, cada uno con un ancho de pulso de 70 ms y una potencia de 250-280 kV/m. Los protocolos para la recuperación y el establecimiento de una estirpe estable de esta
65 célula tri-híbrida de linaje cruzado recién formada se describieron en la Sección 4.1.2.

4.6.1.3. Confirmación del estado de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm

[0262] Se estableció una estirpe celular STmMm derivada de la hibridación celular de una célula Sp2, un linfocito T de ratón primario y un monocito de ratón. Después de que la estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado se hubiera cultivado en condiciones normales (véase la Sección 1.1) durante 6 meses, se analizó la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado para determinar la expresión de marcadores CD específicos de linaje. El análisis por FACS tricolor se utilizó para verificar la coexpresión de CD138 que se origina a partir de células Sp2, CD11b que se origina a partir de monocitos de ratón primarios y CD4 que se origina a partir de linfocitos T primarios de ratón cuando estos linfocitos T primarios se usaron para la hibridación.

10

[0263] En resumen, se suspendieron 100 μ l de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de STmMm a una concentración de 1×10^6 células/ml en PBS que contenía BSA al 5 % en 100 μ l de PBS y se incubaron durante 30 min a 4 °C con anticuerpos monoclonales de rata marcados contra CD138-PE, CD11b-FITC y CD4-PerCP de ratón (BD Pharmingen) o el control de isotipo adecuado. Después de un lavado exhaustivo con PBS, las células marcadas se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur y un software CellQuest Pro.

15

[0264] En la Figura 47 se muestran perfiles de FACS de células tri-híbridadas de linaje cruzado de STmMm. Aunque los niveles de la expresión de CD138, el marcador que deriva de células inmortales de linaje B parece ser uniforme entre la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado, las expresiones de los marcadores que se originan a partir de células primarias parecían variar. En este ejemplo particular, hubo un porcentaje relativamente pequeño de células que no coexpresaron CD4 ni CD11b con CD138 (véase la Figura 47a y b). Cuando se analizaron células STmMm para determinar la coexpresión de CD4 y CD11b (véase la Figura 47c), aproximadamente el 82 % de las células lo hicieron. Efectivamente, el 82 % de la población celular expresó los tres marcadores CD, siendo solo el 5 % de las células positivas para CD138 sin coexpresar CD4 ni CD11b. Cada una de estas diversas poblaciones puede aislarse posteriormente mediante técnicas convencionales tales como FACS, MACS o clonación de una célula individual, etc. y puede expandirse en cultivos tri-híbridos de linaje cruzado separados que procesan características fenotípicas diferentes entre sí manteniendo al mismo tiempo la homogeneidad en el cultivo.

20

25

[0265] Cuando se usaron linfocitos positivos para CD8 citotóxicos en la creación de tri-híbridos de STmMm, se usaron anticuerpos anti-CD8 de ratón-PerCp de rata en lugar de anti-CD4-PerCp para la coexpresión de CD en células tri-híbridadas resultantes. Como se observa en la Figura 48, del 97 al 100 % de las células tri-híbridadas fueron positivas para CD138 (Figura 48a y b), mientras que el 56 % o el 57 % de estas células coexpresaron CD8 (Figura 48b) o CD11b (Figura 48a). Al menos el 40 % de la población de tri-híbridos expresó los tres marcadores CD138, CD8 y CD11b (Figura 48c).

35

[0266] En el caso de linfocitos T $CD4^+CD8^+$ doble positivo, el primer análisis se realizó de la misma manera que para los linfocitos T citotóxicos. La Figura 49 muestra el perfil de FACS de expresión de CD138, CD11b y CD8 en el tri-híbrido resultante. El 98-100 % de las células tri-híbridadas fueron positivas para CD138, siendo el 57-60 % de la población total positiva para los tres marcadores de linaje (Figura 49c). La coexpresión de CD138 y CD8 se detectó en el 93 % de las células (Figura 49b). En la segunda etapa, las células tri-híbridadas se comprobaron para la coexpresión de CD8 y CD4. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD8 de ratón-PE de rata y anti-CD4 de ratón-FITC de rata (BD Pharmingen). La Figura 50 muestra el perfil de FACS de la expresión de CD8 y CD4. Mientras que el 95 % de las células tri-híbridadas expresaron CD8 sobre la superficie, solo el 50 % de las células expresaron conjuntamente CD4 al mismo tiempo. En particular, prácticamente toda la población positiva para CD4 también fue positiva para CD8.

40

45

4.6.2. Producción de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de dos células linfoides de ratón inmortales y un monocito primario de ratón

[0267] Este ejemplo detalla la creación de una estirpe celular de tri-híbridos de linaje cruzado a partir de dos células linfoides B de ratón inmortales (Sp2) y un monocito primario de ratón. La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado se marcó como SSMm seguido de un número de serie.

50

4.6.2.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de SSMm

[0268] La preparación de células Sp2 utilizadas en la creación de tri-híbridos de linaje cruzado de SSMm se ha descrito anteriormente en la Sección 1.1.4. Los monocitos $CD11b^+CD90^+B220^+CD49b^+NK1.1^+Ly6G^{-/bajo}$ de ratón primarios derivados de sangre periférica se usaron en estos experimentos. El aislamiento de los monocitos primarios de ratón a partir de sangre periférica se ha descrito anteriormente (Sección 1.3.5).

55

60

4.6.2.2. Protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de SSMm

[0269] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de SSMm fue el mismo que el utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de STmMm (véase la Sección 4.6.1.2).

4.6.2.3. Confirmación del estado del tri-híbrido de linaje cruzado de SSMm

[0270] Después de que una estirpe celular de tri-híbrido de linaje cruzado de SSMm se hubiera mantenido estable en condiciones normales de cultivo (véase la Sección 1.1) durante 6 meses, la población de células tri-híbridadas de linaje cruzado se analizó para la expresión de marcadores CD específicos de linaje.

[0271] Se aplicó doble tinción o marcaje con anticuerpos anti-CD138 de ratón-PE de rata y anti-CD11b de ratón-FITC de rata (BD Pharmingen) para perfilar la expresión del marcador de linaje cruzado del tri-híbrido de linaje cruzado resultante. La Figura 51 muestra un perfil de CD típico de dichas células tri-híbridadas de linaje cruzado. La expresión del marcador CD138 unido a oncogén parece ser constante en las células tri-híbridadas de linaje cruzado siendo solamente el 7 % de las células negativas para CD138. Una proporción grande de las células (70 %) también expresó CD11b sobre su superficie, mientras que el 23 % restante de células positivas para CD138 fueron negativas para la expresión en superficie de CD11b.

4.7. Producción de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado usando células de mamíferos humanos y no humanos

[0272] Este ejemplo detalla la creación de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado que usan células de mamíferos humanos y no humanos, específicamente ratones. Se entiende que puede aplicarse el mismo principio para generar tri-híbridos de linaje cruzado a partir de otras células de mamíferos.

4.7.1. Producción de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado a partir de una célula linfóide de ratón inmortal, una célula linfóide humana inmortal y un monocito primario ya sea humano o de ratón

[0273] Creación de una estirpe celular de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado a partir de una célula linfóide B de ratón inmortal (Sp2), una célula linfóide B humana inmortal (WIL2NS) y un monocito primario ya sea de ratón o humano. La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado se marcó como SWMm donde se usó monocito de ratón y SWMh donde se usó monocito humano. En cada caso, al nombre abreviado del tri-híbrido le siguió un número de serie.

4.7.1.1. Preparación de células para la producción de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado de SWMm y SWMh

[0274] La preparación de células Sp2 y WIL2NS utilizadas en la creación de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado de SWMm y SWMh se ha descrito anteriormente en la Sección 1.1.4 y la Sección 1.1.3. respectivamente. Los monocitos CD11b⁺CD90⁺B220⁺CD49b⁺NK1.1⁻Ly6G^{-bajo} de ratón primarios derivados de sangre periférica se usaron en estos experimentos. El aislamiento de monocitos primarios de ratón a partir de sangre periférica se ha descrito anteriormente (Sección 1.3.5). Se aislaron monocitos humanos a partir de linfocitos mixtos procedentes de bazo, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. El aislamiento de monocitos se basó en la expresión del marcador CD14 y, en algunos casos, niveles bajos de expresión de CD16, ya sea FACS o perlas magnéticas, como se ha descrito anteriormente en la Sección 1.3.3.1.1. Parece que no hubo diferencias en los parámetros de hibridación o en los tri-híbridos de linaje cruzado resultantes cuando se usaron monocitos de diferentes tejidos linfoides.

4.7.1.2. Protocolo de hibridación celular para producciones de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado de SWMm y SWMh

[0275] El protocolo de hibridación celular para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de SWMm y SWMh fue el mismo que el utilizado para la producción de tri-híbridos de linaje cruzado de STMMm (véase la Sección 4.6.1.2).

4.7.1.3. Confirmación del estado de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado de SWMm y SWMh

[0276] Después de que las estirpes celulares de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado de SWMm y SWMh hubieran permanecido estables en condiciones normales de cultivo (véase la Sección 1.1) durante 6 meses, las poblaciones celulares de tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado se analizaron para determinar la expresión de marcadores CD específicos de linaje.

[0277] Se realizó una doble tinción para la expresión de CD71 humano y TfR de ratón para establecer el quimerismo de los tri-híbridos resultantes. La Figura 52 muestra perfiles de FACS típicos de dicho análisis siendo el 100 % de las células positivas para los receptores de transferrina tanto humanos como de ratón. Esto indica la

dependencia de los tri-híbridos de los controles de división celular del ratón y del ser humano.

[0278] Dependiendo de la fuente de ratón o humana de monocitos primarios, se aplicaron doble tinción o marcaje con anticuerpos anti-CD138 de ratón-PE de rata y anticuerpos anti-CD11b de ratón-FITC de rata (BD Pharmingen) o anticuerpos anti-CD138 de ratón-PE de rata y anticuerpos anti-CD14 humano-FITC de ratón (BD Pharmingen), para perfilar la expresión del marcador de linaje cruzado de los tri-híbridos quiméricos de linaje cruzado resultantes. La Figura 53 muestra perfiles de CD típicos de dichas células tri-híbridas quiméricas de linaje cruzado. La expresión de marcador CD138 unido a oncogén derivado de la estirpe celular Sp2 de ratón parecía depender de la fuente de monocitos humana o de ratón. El porcentaje de células positivas para CD138 de ratón disminuyó del 84 % en tri-híbridos de SWMm al 29 % en los tri-híbridos de SWMh. Sin embargo, el 96 % de las células tri-híbridas quiméricas de SWMh fueron positivas para CD19 humano derivado de WIL2NS (véase la Figura 54), mientras que ninguna de las células en el CD19 humano expresado en tri-híbridos quiméricos de SWMm.

Ejemplo 5

15

5. Enriquecimiento de tri-híbridos de linaje cruzado para células con fenotipos de linaje cruzado específicos basados en la distribución de marcadores CD

[0279] La siguiente Sección proporciona un ejemplo del establecimiento de subestirpes de estirpes celulares tri-híbridas de linaje cruzado basadas en diferentes características fenotípicas. El enfoque se basó en el análisis de marcadores de superficie celular específicos de linaje, la expresión intracelular de marcadores específicos de linaje, la presencia de transcritos de ARN de marcadores específicos de linaje, el cariotipado y la secreción de proteínas específicas de linaje. Se aislaron células tri-híbridas de linaje cruzado con las características deseadas a partir de la población general mediante FACS. El siguiente ejemplo se basa en un tri-híbrido de linaje cruzado de WWM que tenía dos poblaciones tri-híbridas basadas en la expresión de CD14: positiva y negativa. Sin embargo, el ejemplo no se limita de ninguna manera a un tri-híbrido de linaje cruzado o un marcador particular elegido.

[0280] Las células tri-híbridas de linaje cruzado de WWM se clasificaron en fracciones positivas para CD14 y negativas para CD14 y cada una de las fracciones se expandió y se mantuvo en el cultivo por separado durante 3 meses. La Figura 22b muestra que más del 95 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado conservaron la expresión de CD14, mientras que la población de células de la Figura 22c continuó siendo negativa para CD14. Esto demuestra que es posible aislar y establecer diferentes poblaciones de células homogéneas derivadas de la misma estirpe tri-híbrida de linaje cruzado.

35 Confirmación del tri-híbrido de linaje cruzado a través de RT-PCR

[0281] Con el fin de verificar la naturaleza del tri-híbrida de linaje cruzado de las sub-estirpes creadas, las células tri-híbridas originales de linaje cruzado, el subcultivo enriquecido con CD19⁺CD14⁺ y el subcultivo negativo para CD14 se sometieron a ensayos de RT-PCR para CD14. Se usaron monocitos CD14⁺ humanos como control positivo. Las células de control se aislaron de la sangre periférica usando FACS como se ha descrito anteriormente (Sección 1.3.3).

[0282] En resumen, se preparó ARN total a partir de células cultivadas usando el kit RNeasy (RNeasy Mini kit, Qiagen). La síntesis de ADNc se realizó con el kit de ADNc (Amersham Pharmacia) de acuerdo con el protocolo del fabricante y la PCR se realizó esencialmente como se describe en Sewing et al. La mezcla de reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (2 %) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Los pares de cebadores oligonucleotídicos tenían las secuencias 5'-cebador 5'-CACACTCGCCTGCCTTTTCC-3' (SEQ ID NO: 1) y 3'-cebador 5'-GATTCCCGTCCAGTGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 2) para amplificar un producto de PCR de 450 pb.

[0283] Como se muestra en la Figura 23, la RT-PCR reveló la presencia de transcritos de ARNm CD14 tanto en el cultivo original de WWM que contenía células como en el subcultivo enriquecido con CD14⁺ del cultivo original de WWM. También se detectó ARNm de CD14 en el subcultivo de WWM que carecía de CD14 de superficie a un nivel comparable al de los monocitos CD14⁺ humanos.

55

Ejemplo 6

6. Cariotipado

[0284] Se realizó un cariotipado de tri-híbridos de linaje cruzado para establecer las características citogénicas de los tri-híbridos de linaje cruzado, así como para confirmar sus orígenes híbridos.

6.1. Cariotipado de estirpes celulares originales

[0285] Como ejemplo, las células de las estirpes celulares K562 y WIL2NS se cariotiparon para pases tempranos y

posteriores para registrar cualquier inestabilidad cromosómica de las estirpes celulares originales. Se descubrió que, para una estirpe celular dada, por ejemplo, la estirpe K562, el cariotipo de una estirpe recién descongelada era idéntico al de una estirpe celular que se mantuvo en condiciones de cultivo normales durante algunos meses.

5 **[0286]** Las Figuras 24 y 25 representan un cariotipo típico de células K562 y WIL2NS, respectivamente. En ambos casos, se examinó un total de 20 células en metafase con bandas G a 400 bph.

10 **[0287]** Los resultados del cariotipo demostraron que la estirpe celular K562 contenía un único clon con una característica triploide, es decir, que tenía un número modal de 69 cromosomas con diversas anomalías cromosómicas. Por el contrario, la estirpe celular WIL2NS contenía cinco clones diploides con un número de cromosomas de 47 a 48 con anomalías cromosómicas claramente diferentes en comparación con las células K562. La representación de clones en la estirpe celular WIL2NS es la siguiente:

15 El CLON 1 constituye el 10 %
El CLON 2 constituye el 55 %
El CLON 3 constituye el 10 %
El CLON 4 constituye el 20 %
El CLON 5 constituye el 5 %

La Tabla 2 (a continuación) resume los cariotipos complejos de estirpes celulares K562 y WIL2NS. No hay anomalías compartidas entre dos estirpes celulares. Las anomalías cromosómicas presentes en todos los clones de las estirpes celulares WIL2NS se resaltan en azul

Nombre Clon Crom	K562 1 (100%) 69	WIL2NS				
		1 (10%) 47	2 (55%) 47	3 (10%) 48	4 (20%) 47	5 (5%) 47
1					del(1)(q32q42)	del(1)(q32q42) der(1)t(1;3)(p34.4;q42)
2	inv(2)(q33q35)					
3	-3					
4						
5	+der(5)t(5;7)(q11.2;?)					
6	dup(6)(p21.1p23)					
7						
8		der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23) der(8)t(8;15)(q24.1;q22)	der(8)t(1;8)(p32;p23) der(8)t(8;15)(q24.1;q22)
9	-9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)					
10	der(10)t(3;10)(p21;p24)					
11						
12						
13	-13, add(13)(p11.1)	+13	+13	+13x2	+13	+(13)(q10)
14	-14	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)
15						
16						
17	add(17)(p13)x2	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)
18	der(18)t(1;18)(p32;q23)					
19						
20	-20					
21	der(21)t(1;21)(q12p11.1)		der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)
22	-22					
XY	XX, -X	XY	XY	XY	XY	XY
Marcadores:	+mar1, mar2, +mar3, +mar4, +mar5					

5

6.2. Cariotipado de tri-híbridos de linaje cruzado utilizados para la expresión de proteínas

[0288] Los tri-híbridos de linaje cruzado derivados de diversas combinaciones de células inmortales y primarias de tres linajes diferentes y utilizados adicionalmente para la expresión de proteínas deseadas se cariotiparon. Estos cariotipos también se compararon con los de las estirpes celulares inmortales originales, que se usaron en la creación de los tri-híbridos de linaje cruzado.

6.2.1. Cariotipado de estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KBT

[0289] Se cariotiparon dos estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KBT derivadas de la estirpe celular mieloide inmortal K562 y los linfocitos primarios B y T. El tri-híbrido de linaje cruzado de KBT derivado de células B activadas (CD20⁺CD72⁺) y linfocitos T doble positivo (CD4⁺CD8⁺) con diversos tipos celulares en función de sus características de expresión de CD (Sección 4.2.3) también se cariotipó para la comparación. Las Figuras 26 muestran un cariotipo típico de estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KBT derivadas de la hibridación K562 + B(CD19⁺) + T(CD4⁺), denominada estirpe KBT-1. Mostró que un clon de una célula individual de KBT-1 era casi triploide, con un número modal de 66 cromosomas.

[0290] Cuando una estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de KBT derivada de la hibridación celular de células K562, células B (CD20⁺CD72⁺) y linfocitos T (CD4⁺CD8⁺), denominada estirpe KBT-2, se cariotipó, se descubrió que el cariotipado de la estirpe KBT-2 (la estirpe que había mostrado una variación de expresiones de CD en la Sección anterior) consistía en cuatro clones que eran casi triploides. El Clon 1, el clon 2, el clon 3 y el clon 4 representaron el 5 45 %, el 30 %, el 15 % y el 10 % de la población celular, respectivamente. El clon 4 tenía un número modal de cromosomas de 66, mientras que los otros clones tenían un número modal de cromosomas de 67 cada uno. La Figura 27 muestra un cariotipado de uno de los clones de la estirpe KBT-2.

[0291] Los cariotipados de las estirpes KBT-1 y KBT-2 se resumen en la Tabla 3. La primera columna de la Tabla 10 indicó el número de cromosomas. Algunos de los cambios cromosómicos, tales como del(3)(p14), der(4)t(4;?)(q25;?), +der(7)t(7;mar3)(q10;q10)and der(X)t(X;?)(q13;?;?) son compartidos por todos los tri-híbridos de linaje cruzado independientemente del subtipo de células linfoides primarias, pero no se comparten con las células K562.

Tabla 3. Un resumen de un análisis comparativo de KBT-1 y KBT-2 derivadas de diferentes subtipos celulares linfoides primarios y de la estirpe celular mieloide K562 como fuente de oncogén. Las anomalías cromosómicas de la estirpe K562 compartida con estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KBT-1 y KBT-2 se resaltan en azul. Las anomalías cromosómicas compartidas entre los clones de las estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KBT, pero no de la estirpe celular K562 original, se resaltan en rojo. Las anomalías cromosómicas presentes en algunos de los tri-híbridos de linaje cruzado de KBT y derivadas de la estirpe K562 se resaltan en verde.

Nombre	K562	KBT				
		(CD19+) & (CD4+)	(CD20+CD72+) & (CD8+CD4+)			
Subestirpe						
N.º de clon	1 (100%)	1 (100%)	1 (45%)	2 (30%)	3 (15%)	4 (10%)
N.º de crom	69	65-66	66-68	65-67	67-68	66
1		-1	der(1)t(1;24)(q21.3;q25)	der(1)t(1;24)(q21.3;q25)	der(1)t(1;4)(p10;p10)	der(1)t(1;4)(p10;p10)
2	inv(2)(q33;q35)	inv(2)(q33;q35)	inv(2)(q33;q35)	inv(2)(q33;q35)	inv(2)(q33;q35)	inv(2)(q33;q35)
3	-3	-3 del(3)(p14)				
4		der(4)t(4;7)(q35;q?)	del(4)(c25;q35)	der(4)t(4;7)(q25;q?)		-4
5	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?)	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?)	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?)	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?)	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?)	+der(5)t(5;7)(q11.2;q?) der(5)t(5;7)DC(p10;p10)
6	dup(6)(p21.1;p23)	dup(6)(p21.1;p23)	dup(6)(p21.1;p23)	dup(6)(p21.1;p23)	dup(6)(p21.1;p23)	dup(6)(p21.1;p23)
7		-der(7)t(7;mar3)(q10;q10)	-der(7)t(7;mar3)(q10;q10)	-der(7)t(7;mar3)(q10;q10)	-der(7)t(7;mar3)(q10;q10)	-der(7)t(7;mar3)(q10;q10)
8						
9	-9 del(9)(p13) der(9)t(9;9)(p12;q22)					
10	der(10)t(3;10)(p21;p24)	der(10)t(3;10)(p21;p24)	der(10)t(3;10)(p21;p24)	der(10)t(3;10)(p21;p24)	der(10)t(3;10)(p21;p24)	der(10)t(3;10)(p21;p24)
11						
12						
13	-13 add(13)(p11.1)					
14	-14	-14	-14	-14	-14	-14
15		-15				
16						
17	add(17)(p13)x2	add(17)(p13)x2	add(17)(p13)x2	add(17)(p13)x2	add(17)(p13)x2	add(17)(p13)x2
18	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)
19						
20	-20	-20	-20	-20	-20	-20
21	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)
22	-22	-22	-22	-22	-22	-22
XY	XX-X	X-X der(3)t(X;7)(q13;q?)	X-X der(3)t(X;7)(q13;q?)	X-X der(3)t(X;7)(q13;q?)	X-X der(3)t(X;7)(q13;q?)	X-X der(3)t(X;7)(q13;q?)
Marcadores	mar1, mar2, mar3, mar4, mar5	mar2, mar4, mar5, mar10	mar1, mar2, mar4, mar5	mar1, mar2, mar4, mar5	mar1, mar2, mar4, mar5	mar1, mar2, mar4, mar5

6.2.2. Cariotipado de estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KWT

10

[0292] Se cariotiparon estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KWT derivadas de la estirpe celular mieloide inmortal K562, la estirpe de células linfoides B inmortales WIL2NS y un linfocito T primario. También se cariotipó un tri-híbrido de linaje cruzado de KWT derivado de linfocitos T doble positivo (CD4⁺CD8⁺) (denominado KWT-3) con diversos tipos de células basándose en sus características de expresión de CD (Sección 4.4.3) para su comparación.

15

[0293] Las Figuras 28, 29 y 30 muestran cariotipos típicos de estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de KWT-1, KWT-2 y KWT-3, respectivamente. En cada caso, se analizaron un total de 20 células en metafase con bandas G a 400 bph. KWT-1 contenía un único clon que era casi hexaploide ($6n = 138$ cromosomas). El número modal de cromosomas varió de 129 a 140 cromosomas con heterogeneidad cariotípica, es decir, todas las células analizadas compartieron algunas de las anomalías cromosómicas. KWT-2 contenía un único clon que también era casi hexaploide. El número modal de cromosomas varió de 135 a 145 cromosomas con heterogeneidad cariotípica. KWT-3 contenía tres clones que eran hiperpentaploides ($n > 115$). El Clon 1 y los Clones 2 y 3 representan el 55 %, el 20 % y el 25 % de la población celular, respectivamente. Los cariotipos de tri-híbridos de linaje cruzado de KWT confirmaron que las características genéticas de ambas estirpes celulares K562 y WIL2-NS se conservan en todos los tri-híbridos de linaje cruzado de KWT, independientemente del tipo de linfocito T primario utilizado en su creación. La Tabla 4 resume un análisis comparativo de cariotipos de estos tri-híbridos de linaje cruzado de KWT (es decir, estirpes KWT-1, KWT-2 y KWT-3).

Tabla 4. Un análisis comparativo de los tri-híbridos de linaje cruzado de KWT derivados de diferentes tipos de linfocitos T primarios. Los cambios cromosómicos en tri-híbridos de linaje cruzado de KWT compartidos con la estirpe celular K562 se resaltan en rojo. Los cambios cromosómicos compartidos entre los tri-híbridos de linaje cruzado de KWT y la estirpe celular WIL2NS se resaltan en azul. Los cambios que se comparten entre diferentes subtipos de los tri-híbridos de linaje cruzado, pero no con la estirpe celular K562 ni con la estirpe celular WIL2NS se resaltan en verde.

Nombre	K562	WIL2NS		KWT				
Subestirpe				CD4+	CD3+CD5+	CD4+CD8+		
Clon	1 (100%)	2 (55%)	3 (10%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (55%)	2 (20%)	3 (25%)
Crom	69	47	48	129-140	135-142	124-139	125-131	131-132
1				-1	-1	-1	+1	+1
2	inv(2)(q35)			-2, inv(2)(q35)	-2, inv(2)(q35)	+2, +2, inv(2)(q35)	+2, +2, inv(2)(q35)	+2, +2, der(2)(q10)inv(2)(q35)
3	-3			-3,-3	-3,-3	-3	-3	-3
4				-4, der(4)(q35)	-4, der(4)(q35)			
5	der(5)(q21)q22			der(5)(q21)q22	5, der(5)(q21)q22	der(5)(q21)q22	der(5)(q21)q22	der(5)(q21)q22
6	dup(6)(p21)q23			+6, dup(6)(p21)q23	+6, dup(6)(p21)q23	+6, dup(6)(p21)q23	+6, dup(6)(p21)q23	+6, dup(6)(p21)q23
7				+7, inv(7)(p13)q22	+inv(7)(p13)q22	+inv(7)(p13)q22	+inv(7)(p13)q22	+inv(7)(p13)q22, dic(7)(p22)q11
8		der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23	der(8)(18)(p32)q23
9	-9, der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22			-9, -9, der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22	-9, -9, der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22	der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22	-9, der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22	-9, der(9)(p13), der(9)(9)(p12)q22
10	der(10)(3,10)(p23)q24			der(10)(3,10)(p23)q24	der(10)(3,10)(p23)q24	+10, +10, der(10)(3,10)(p23)q24	+10, +10, der(10)(3,10)(p23)q24	+10, +10, der(10)(3,10)(p23)q24
11								
12				-12	-12			
13	+13, add(13)(p11)	+13	+13a2	add(13)(p11)	add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)
14	-14	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12	der(14)(5,14)(p10)q12
15				-15	-15			
16								
17		dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	-17, dup(17)(q22)q2, add(17)(p13)q2	-17, dup(17)(q22)q2, add(17)(p13)q2	dup(17)(q22)q23, add(17)(p13)q2, +add(17)(p13)	dup(17)(q22)q23, add(17)(p13)q2, +add(17)(p13)	dup(17)(q22)q23, add(17)(p13)q2, +add(17)(p13)
18	der(18)(1,18)(p23)q23			-18, -18	-18, -18	+18, der(18)(1,18)(p23)q23	+18, der(18)(1,18)(p23)q23	+18, der(18)(1,18)(p23)q23
19						+19	+19	+19
20	-20				+20	-20	-20	-20
21	der(21)(21)(q22)q22	der(21)(3,21)(q21)q11	der(21)(3,21)(q21)q11	der(21)(21)(q22)q22	der(21)(21)(q22)q22	der(21)(21)(q22)q22	der(21)(21)(q22)q22	der(21)(21)(q22)q22
22	-22			-22	-22			
XY	XX, X	XY	XY	XXXY, X, X	XXXY, X, X	XXXY	XXXY	XXXY
Marcadores	+mar1, mar2, +mar3, +mar4, +mar5			+mar1, mar2a2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar11	+mar1, mar2a2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar9, +mar11	+mar1, mar2, +mar3, +mar4a2, +mar5a2	+mar1, mar2, +mar3, +mar4a2, +mar5a2	+mar1, mar2, +mar3, +mar4a2, +mar5a2

6.2.3. Cariotipado de estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de WWM

10

[0294] Se cariotiparon una estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de WWM derivada de dos células linfoides B inmortales (2 estirpes WIL2NS) y monocitos primarios (CD14⁺). La subestirpe de este tri-híbrido de linaje cruzado enriquecida para células CD14⁺ también se cariotipó. Las Figuras 31A y 31B muestran cariotipos del tri-híbrido de linaje cruzado de WWM original y su subestirpe enriquecida con CD14⁺, respectivamente. En cada caso, se analizaron cromosomas en metafase con bandas G de un total de 20 células a 400 bph. El tri-híbrido de linaje cruzado de WWM original contenía un único clon dominante que tenía un número modal de 47 cromosomas se encontró en 11 células (55%). Sin embargo, las 9 células restantes analizadas varían desde casi triploides (con pérdida aleatoria de cromosomas) hasta casi tetraploides (con pérdida aleatoria de cromosomas). No hubo uniformidad entre ninguna de estas células. Por otro lado, el cariotipo del tri-híbrido de linaje cruzado de WWM enriquecido con CD14⁺ indicó una única anomalía clonal detectada en 19 células. Solo se detectó una célula

15

20

tetraploide.

La Tabla 5 resume el análisis comparativo de los cariotipados de las estirpes tri-híbridas de linaje cruzado de WWM. Las características cromosómicas compartidas con las células WIL2-NS se resaltan en azul.

Nombre Subestirpe	WIL2-NS					WWM	
	1 (10%)	2 (55%)	3 (10%)	4 (20%)	5 (5%)	CD14+	CD14+en
Clon						55%	95%
Crom	47	47	48	47	47	47	47
1				del(1)(q32q42)	del(1)(q32q42) der(1)t(1;3)(p34.4;q42)		
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23) der(8)t(8;15)(q24.1;q22)	der(8)t(1;8)(p32;p23) der(8)t(8;15)(q24.1;q22)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)
9							
10							
11							
12							
13	+13	+13	+13x2	+13	+13(q10)	+13	+13
14	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)
15							
16							
17	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)
18							
19							
20							
21		der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)
22							
XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY

Ejemplo 7

7. Detección del genoma del VEB por PCR

[0295] Para ensayos de PCR y para una estirpe celular de tri-híbridos de linaje cruzado dada, el ADN genómico se extrajo de 5x10⁶ células del tri-híbrido de linaje cruzado. Se usaron células MOLT-4 como control negativo, mientras que se usó CO 88BV59-1 como control positivo usando un kit QIAamp DNA Micro kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el ensayo de PCR cualitativa, la región BamHI W del genoma del VEB se amplificó con cebadores específicos. Las secuencias de cebadores corriente abajo y corriente arriba fueron 5'-CAAGAACCCAGACGAGTCCGTAGAA-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-AAGAAGCATGTATACTAAGCCTCCC-3', (SEQ ID NO: 4) respectivamente (Kimura, et al., 1999). Se añadieron 10 ng del ADN extraído a la mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, dNTP 200 μM, 0,6 μM de cada cebador y 0,5 U de polimerasa Taq (Lomb Life Science). Después de la desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95 °C, se realizaron 28 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C usando el sistema GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer). Las muestras amplificadas se separaron en un gel de agarosa al 2 %.

[0296] Los resultados de los ensayos anteriores indicaron que se descubrió que todos los tri-híbridos de linaje cruzado establecidos en la presente invención son negativos para el genoma del VEB.

Ejemplo 8

8. Ensayo de Mycoplasma

[0297] Se realizaron ensayos de Mycoplasma en cualquiera de las estirpes celulares utilizadas y en las estirpes de tri-híbridos de linaje cruzado creadas en la presente invención usando un kit de detección por PCR de micoplasma (Lomb Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados del ensayo indicaron que se descubrió que todas las estirpes celulares y los tri-híbridos de linaje cruzado carecían de micoplasma.

Ejemplo 9**9. Expresión de proteínas en un sistema de expresión de tri-híbridos de linaje cruzado y su caracterización**

5 **[0298]** El sistema de células de linaje cruzado de tri-híbridos incorporado en la presente invención puede usarse para la preparación de una gama de productos biológicos, incluyendo, pero no limitada a, moléculas biológicas tales como proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y moléculas químicas de los mismos. Específicamente, las moléculas biológicas pueden incluir citocinas, hormonas de factores de crecimiento, receptores o moléculas químicas o fragmentos de los mismos. El experto en la materia comprenderá que una molécula biológica deseada, tal como una proteína expresada a partir de la célula de linaje cruzado de tri-híbrido puede secretarse, unirse a una membrana o ambas cosas. El experto en la materia comprenderá adicionalmente que diversas subunidades de proteínas puedan coexpresarse en células tri-híbridas de linaje cruzado, por ejemplo, expresión de inmunoglobulina y más específicamente producción de anticuerpos monoclonales. El experto en la materia comprenderá adicionalmente que la célula de linaje cruzado tri-híbrida también puede usarse para expresar una gama de proteínas o fragmentos de péptidos funcionales, por ejemplo, en el caso de inmunoglobulinas, fragmentos tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, incluyendo los fragmentos Fv monocatenarios.

[0299] La expresión de la proteína deseada puede conseguirse en el sistema de células tri-híbridas mediante hibridación de células somáticas de la célula tri-híbrida con una célula compañera que expresa la proteína deseada (Sección 9.1). Como alternativa, las células tri-híbridas pueden someterse a protocolos de transfección génica convencionales para facilitar la expresión de una proteína deseada (Sección 9.2.1 y 9.2.2). En una realización adicional, las células tri-híbridas pueden expresar múltiples proteínas diana simultáneamente mediante el uso de hibridación de células somáticas o transfección de genes convencional o ambas cosas (Sección 9.3).

25 **[0300]** Los siguientes ejemplos ilustran la expresión de una serie de tipos diferentes de proteínas, en células tri-híbridas de linaje cruzado. Los ejemplos también demuestran que las proteínas, específicas de un tipo celular diferenciado particular, pueden expresarse en las mismas células tri-híbridas de linaje cruzado (por ejemplo, inmunoglobulina y CD54).

30 9.1. Hibridación de la célula de linaje cruzado tri-híbrida con una célula que expresa una proteína deseada**9.1.1. Expresión de GM-CSF humano**

[0301] La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de WWM enriquecida para células positivas para CD14 (descrita en la Sección 5) se usó como estirpe celular compañera en este ejemplo particular. Se usaron linfocitos positivos para CD4 humanos activados aislados como se ha descrito en la Sección 1.3.3.1.1. como fuente de GM-CSF humano. El procedimiento de hibridación de células eléctricas fue esencialmente el mismo que el utilizado para la creación de tri-híbridos de linaje cruzado de WWM como se ha descrito en la Sección 4.3.2. Después de que el híbrido resultante de linfocitos T cultivados WWM y CD4⁺ se volviera estable, se mantuvo como una estirpe celular y se marcó como ProGM.

Resultados de la expresión de GM-CSF humano

45 **[0302]** Se sometieron a ensayo sobrenadantes de ProGM para determinar el GM-CSF humano mediante ELISA de tipo sándwich. Se recubrió una placa ELISA de 96 pocillos (Corning) con 50 µl de anticuerpo policlonal de conejo purificado anti-GM-CSF a 10 µg/ml a 4 °C durante la noche. Después de la retirada de la solución de anticuerpo, los sitios de unión de proteínas residuales en las placas se bloquearon con 100 µl de PBS que contenía BSA al 5 % (BSA al 5 %-PBS). Después se añadieron 50 µl de un sobrenadante de cultivo de la estirpe celular híbrida ProGM a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar con PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20 (Tween-PBS) tres veces, se incubaron con 50 µl de anticuerpo de conejo anti-GM-CSF a 10 µg/ml a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con Tween-PBS, se incubaron con una inmunoglobulina anti-conejo conjugada con peroxidasa diluida 200 veces durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de aclarar tres veces con Tween-PBS, la reacción final se visualizó mediante incubación con ABTS y peróxido de hidrógeno al 0,01 %. Se midió la absorbancia a 415 nm. Se usó GM-CSF humano recombinante como patrón. Todos los análisis se realizaron por duplicado para una muestra dada. Los resultados mostraron que ProGM produjo GM-CSF humano en el intervalo de 0,7 a 1,1 µg/ml/10⁶ células en condiciones de cultivo no optimizadas.

60 **[0303]** La caracterización de hGM-CSF derivado de ProGM híbrido mediante transferencia Western e inmunoprecipitación confirmó que el híbrido ProGM produjo GM-CSF completamente humano que presentaba formas de glucoproteínas idénticas a las glucoformas secretadas de forma natural por los linfocitos humanos. Los sobrenadantes recogidos de ProGM híbrido se diluyeron 100 veces antes del análisis. Se usaron membranas de inmunotransferencia NC para análisis por transferencia Western (Millipore) y anticuerpo biotinilado anti-GM-CSF humano de rata (R&D systems) a una concentración de 0,1 µg/ml para la detección por transferencia Western. En la Figura 32, la transferencia Western de hGM-CSF secretado por el híbrido ProGM (carril 4) mostró la misma heterogeneidad de sus formas que el GM-CSF secretado por el cultivo de linfocitos humanos activados por PHA

(carril 2). La distribución de pesos moleculares de GM-CSF expresada tanto en ProGM como en cultivos de linfocitos varió entre 18 kDa y 35 kDa. En presencia de tunicamicina, que inhibe la adición de cadenas de hidratos de carbono a los restos de asparagina, las moléculas de mayor peso molecular (es decir, 35 kDa) no se detectaron, lo que indica que la heterogeneidad observada se debe a un grado diferente de glucosilación (carril 5). Los pesos moleculares de las formas de GM-CSF producidas por los linfocitos activados por PHA o en el sistema de expresión híbrido ProGM fueron mayores que el del GM-CSF derivado de *E. coli* (carril 6).

[0304] Los sobrenadantes del híbrido ProGM cultivado con o sin complementación con 10 µg/ml de tunicamicina se recogieron y se incubaron durante la noche a 40 °C con anticuerpo anti-GM-CSF humano de rata o anticuerpo anti-GM-CSF de ratón de conejo contra GM-CSF humano o de ratón derivado de *E. coli*, respectivamente. Se añadió proteína A-Sepharose (Invitrogen) y se incubó adicionalmente durante 3 horas a temperatura ambiente. La resina recuperada se lavó minuciosamente con NaCl 0,15M, NP-40 al 0,5 %, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Las proteínas unidas se solubilizaron con tampón de muestra Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 33, el peso molecular del GM-CSF secretado por el híbrido ProGM varía de 18 kDa a 35 kDa, que es similar a las formas de origen natural. Esta heterogeneidad se debe a la diferente glucosilación en dos sitios de N-glucosilación y varios sitios de O-glucosilación. En presencia de tunicamicina, las bandas de mayor peso molecular no se detectaron mientras que las proteínas de menor peso molecular de 18-22 kDa se acumularon. Estos datos confirman que el hGM-CSF derivado de ProGM híbrido se secreta como glucoproteína humana.

20 9.1.2. Expresión de inmunoglobulinas humanas

[0305] La estirpe tri-híbrida de linaje cruzado de KWT derivada de linfocitos T con experiencia antigénica (CD3⁺CD5⁺) (denominada KWT-2) con marcadores fenotípicos según se determinó por FACS (véase la Sección 4.4.3 para más detalles) y cariotipada como se ha descrito en la Sección 6.2.2, se usó para la expresión de inmunoglobulina humana a través de hibridación celular eléctrica. Específicamente, el tri-híbrido de linaje cruzado de KWT se usó como estirpe celular compañera en este ejemplo particular. Se usaron CD40 primarios activados con células B positivas para IgM o positivas para IgG aisladas como se ha descrito en la Sección 1.3.3 como fuente de Ig humana. El procedimiento de hibridación eléctrica de células fue esencialmente el mismo que el que se usó para la creación de estirpes tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT como se ha descrito en la Sección 4.4.2. Una vez que los híbridos resultantes se estabilizaron, se mantuvieron y se marcaron como estirpes celulares ProIM o ProIG (véase la Sección 1.1).

Resultados de la expresión de inmunoglobulinas humanas

[0306] Los sobrenadantes de ProIM y ProIG se analizaron para determinar la presencia de IgM o IgG mediante un ELISA descrito anteriormente (véase la Sección 1.3.3). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 1×10^5 células por pocillo y se cultivaron en condiciones convencionales durante 24 horas. El recuento de células y la viabilidad se realizaron usando un hemocitómetro y la exclusión con azul tripano. Los resultados se resumen en las Tablas 6A y 6B. Cada valor se proporciona como media \pm DT de tres mediciones independientes.

Tabla 6A. Crecimiento celular y producción de IgM de células ProIM

Exp	Densidad de células viables (células/ml)	Producción de IgM (ng/ml)	Productividad de IgM (ng/10 ⁴ células/24 horas)
1	1,2x10 ⁵	310 \pm 12,3	26,7
2	1,4x10 ⁵	512 \pm 20,1	36,6
3	1,1x10 ⁵	298 \pm 10,5	27,1
4	1,2x10 ⁵	387 \pm 15,1	32,3
5	1,5x10 ⁵	701 \pm 23,4	46,7

Tabla 6B. Crecimiento celular y producción de IgG de células ProIG

Exp	Densidad de células viables (células/ml)	Producción de IgG (ng/ml)	Productividad de IgG (ng/10 ⁴ células/24 horas)
1	8,0x10 ⁴	84 \pm 5,9	10,5
2	8,1x10 ⁴	85 \pm 3,7	10,5
3	8,0x10 ⁴	76 \pm 4,3	9,5
4	8,2x10 ⁴	89 \pm 6,1	10,9
5	8,2x10 ⁴	82 \pm 4,3	10,0

[0307] Se detectaron subclases de IgG y subtipos de cadenas ligeras usando la anti-IgG 1 (clon HP6069), IgG2 (clon HP6002), IgG3 humana de ratón biotinilada (clon HP6047), IgG4 humana de ratón biotinilada (clon HP6025) (ICN Biomedicals) y el anticuerpo anti-cadena kappa y lambda humana de cabra biotinilada (Biosource). El anticuerpo biotinilado unido se detectó con estreptavidina conjugada con ALP.

[0308] Los resultados mostraron que tanto la IgM como la IgG producidas por las células ProIM y ProIG, respectivamente, tenían una cadena κ ligera y la IgG de clase IgG2.

9.1.3. Expresión de CD54 humano

5

Metodología para la expresión de CD54 humano

[0309] El tri-híbrido de linaje cruzado de KWT derivado de un linfocito T auxiliar maduro (CD4⁺) (denominado KWT-1) con marcadores fenotípicos según se determinó por FACS (véase la Sección 4.4.3 para más detalles) y cariotipado como se ha descrito en la Sección 6.2.2 se usó adicionalmente para la expresión de CD54 humano a través de la hibridación celular eléctrica. Específicamente, el tri-híbrido de linaje cruzado de KWT se usó como una estirpe celular compañera en este ejemplo particular. Se usaron linfocitos T positivos para CD54 humano primarios aislados como se ha descrito en la Sección 1.3.3 como fuente de la molécula de CD54 humano. El procedimiento de hibridación fue esencialmente el mismo que el utilizado para la creación de estirpes tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT (véase la Sección 4.4.2). Una vez que el híbrido resultante se volvió estable, se mantuvo como una estirpe celular en condiciones de cultivo convencionales (véase la Sección 1.1) y se marcó como ProCD54.

Resultados de la expresión de hCD54

[0310] La expresión de CD54 sobre la superficie de células ProCD54 se verificó mediante un análisis por FACS. Como el 100 % de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT originales expresaban CD4 sobre su superficie (véase la Figura 19), la expresión de CD4 sobre la superficie de la célula ProCD54 se usó como referencia para la estabilidad de la estirpe celular resultante. En resumen, se marcaron 1×10^5 células por alícuotas de 100 μ l con anticuerpos anti-CD54 humano-FITC de ratón y anti-CD4 humano-PE de ratón siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito en la Sección 1.3.3.1 (aislamiento de linfocitos T CD54⁺). El perfil típico de la expresión de CD4 y CD54 sobre la superficie de las células ProCD54 se muestra en la Figura 34a. Aproximadamente el 72 % de las células ProCD54 originales fueron positivas para CD54, mientras que el 100 % de las células conservaron su expresión de CD4, incluso aunque los niveles de la expresión de CD4 parecían ser algo más bajos que los de las células tri-híbridadas de linaje cruzado de KWT. Después de configurar las ventanas apropiadas, la población de células CD4⁺CD54⁺ con niveles medios a altos de expresión de CD54 (aproximadamente el 42 % de la población celular total) se seleccionó y se clasificó (Figura 34a). Las células clasificadas se resuspendieron en medio de cultivo convencional y se mantuvieron en el cultivo durante unos pocos meses. La sub-estirpe resultante se etiquetó como ProCD54EX. Después se analizó la subestirpe para determinar su expresión de CD4 y CD54 empleando el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente en la presente sección. El perfil típico de expresión de CD4 y CD54 sobre la superficie de ProCD54EX se muestra en la Figura 34b. Como puede observarse a partir de la figura, al menos el 98 % de las células mantuvieron la expresión de CD4 y CD54 después de 6 meses de cultivo en condiciones convencionales. Aún más, la expresión de CD54 se volvió homogénea a niveles medios.

[0311] El ProCD54 y el ProCD54EX también se analizaron para determinar la presencia de un CD54 soluble en los sobrenadantes de cultivo tisular mediante el uso de ELISA de CD54 (ICAM-1) humano (sistemas de R&D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se recogieron el día 7 en cultivo al menos 3 veces. Se usaron los sobrenadantes de la estirpe celular compañera tri-híbrida de linaje cruzado de KWT como control negativo. Todas las mediciones se realizaron con la misma muestra por duplicado. En resumen, las placas de microtitulación se recubrieron con un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra la ICAM-1 soluble humana. Después de la incubación con control, las muestras o los patrones en una dilución apropiada, se añadió un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) contra ICAM-1 soluble humana. Después de la adición del sustrato y la solución de parada, la densidad óptica de cada pocillo se determinó en 30 minutos, usando un lector de microplacas configurado a 450 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

50 Tabla 7. Un intervalo de concentraciones de CD54 soluble (ICAM-1) en la estirpe celular compañera trihíbrida de linaje cruzado de KWT, estirpes celulares ProCD54 y ProCD54EX

Estirpe celular	Concentración más baja, ng/ml	Concentración más alta, ng/ml
KWT	0	0
ProCD54	420	1320
ProCD54EX	910	2870

[0312] El peso molecular del desprendimiento de CD54 soluble de ProCD54 y ProCD54EX se determinó mediante electroforesis en gel y análisis de transferencia Western. En resumen, la concentración de proteína en los sobrenadantes se determinó mediante un ensayo de proteínas (R&D systems) y se ajustó a 1,8 mg/ml. La electroforesis se realizó mediante SDS-PAGE. Se cargó un total de 30 ml de la muestra en el gel en un tampón de muestra no reductor. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad). La membrana secante se bloqueó con leche en polvo sin grasa (5 %) en tampón TBS-Tween (TBST) y se agitó durante 2 horas con un anticuerpo anti-ICAM-1 humana de ratón (dilución 1:100 en TBST).

60 Después de lavar las muestras con TBST, se añadió el reactivo secundario, anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra

unido a HRP (dilución 1:10.000). Después de un lavado repetido con TBST, la membrana se aclaró con agua. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. La Figura 35 muestra que CD54 está presente en los sobrenadantes de ProCD54 y de ProCD54EX como una única especie de aproximadamente 82 kDa, lo que corresponde al CD54 soluble detectado en suero humano.

5

[0313] La expresión de ARNm para CD54 humano en células tanto ProCD54 como ProCD54EX se verificó mediante RT-PCR. El ARN total se extrajo con un kit comercial y la detección por RT-PCR de la expresión génica se realizó como se ha descrito anteriormente en la Sección 5. Un conjunto de cebadores de ICAM-1 humana [sentido, 5'-CCGGAAGGTGTATGAACTG-3'; (SEQ ID NO: 5) antisentido, 5'-TCCATGGTGATCTCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 6)] se usó para sondear el ADNc transcrito inversamente de muestras de ARN experimentales y de control. Se incluyó un par de cebadores para ciclofilina en cada ensayo como control interno [sentido, 5'-TGTTCTTCGACATTGCCGTCGAC-3'; (SEQ ID NO: 7) antisentido 5'-GCATTTGCCATGGACAAGATGCCAGGA-3' (SEQ ID NO: 8)]. Los productos de la reacción de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3 % en un tampón de trisacetato que contenía bromuro de etidio y se fotografiaron y digitalizaron las bandas fluorescentes inducidas por UV. La Figura 36 muestra un análisis por RT-PCR de ARNm para ICAM-1 humana en ProCD54 y ProCD54EX. Las células tri-híbridas de linaje cruzado de KWT, que no expresan CD54 en la superficie celular también muestran una transcripción muy baja del gen ICAM-1.

9.2. Transfección de la estirpe celular de linaje cruzado tri-híbrida con un gen que codifica una proteína deseada

[0314] Se pueden introducir genes específicos en células cultivadas mediante una serie de técnicas convencionales, incluyendo la transferencia de genes mediada por vectores. En una realización de la presente invención, las células de linaje cruzado tri-híbridas se transfectaron transitoriamente con un gen que codificaba una proteína deseada. Esto permite obtener productos genéticos, ya sea ARN o proteína, a las pocas horas de la absorción del ADN. En una realización alternativa de la presente invención, la célula de linaje cruzado tri-híbrida se transfectó de forma estable con un gen que codificaba una proteína deseada. Esto implica que el ADN plasmídico del vector se integre en la cromatina de la célula hospedadora.

9.2.1. Transfección transitoria

[0315] El tri-híbrido de linaje cruzado de KBT derivado de células B maduras (CD19⁺) y de linfocitos T auxiliares maduros (CD4⁺) compartiendo el 100 % de las células tri-híbridas de linaje cruzado marcadores fenotípicos de células B y T según se determinó por FACS (véase la Sección 4.2.3) y cariotipado como se ha descrito en la Sección 6.2.1 se usó para experimentos de transfección de genes. Como ejemplo de transfección transitoria de células de una estirpe de tri-híbridos de linaje cruzado con una proteína deseada, las células de un tri-híbrido de linaje cruzado de KBT se transfectaron con cadena alfa de receptor de IL-4 humano (hIL4-R α).

Método

40

[0316] La preparación de células PBML a partir de una muestra de médula ósea se ha descrito en la Sección 1.3.1. Se clonó ADNc de hIL4-R α clonado a partir de un total de 1×10^6 células PBML incubadas con 100 ng/ml de IL-4 humana recombinante (R&D systems) durante 24 horas en condiciones de cultivo convencionales. Se extrajo el ARN total (RNeasy Mini Kit, Qiagen) y se sintetizó el ADNc usando el kit de purificación de ADNc First Strand (Amersham Pharmacia). Se usó PCR para amplificar el ADNc de hIL4-R α . La amplificación se realizó con el cebador sentido 5'-AGGGGCGCGCAGATAATTTAAA-3' (SEQ ID NO: 9) y el cebador antisentido 5'-AGTGGGCCAATCACCTTCATA-3' (SEQ ID NO: 10). Se usó una PCR anidada para añadir dos sitios de restricción BamHI al fragmento hIL4-R α [cebador sentido 5'-GGATCCGCGCAGATAATTTAAAGA-3', (SEQ ID NO: 11) cebador antisentido 5'-GGATCCAAATCACCTTCATACCAT-3' (SEQ ID NO: 12)]. El ADNc amplificado se diluyó y se sometió a una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, seguido de 31 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 45 segundos a 59 °C, 3 minutos a 72 °C. El fragmento de ADNc de IL4R se ligó en el vector de clonación pGEM-T (Promega) y se transfectó en células competentes JM109 (Promega). Se preparó ADN plasmídico usando un kit Plasmid Mini Kit (Qiagen).

[0317] Para la electroporación, se mezclaron 7×10^6 de las células KBT suspendidas en 350 μ l de medio TC completo (véase la Sección 1.1) con 30 μ g de plásmido de ADNc. La transfección se realizó mediante un único pulso (25 kV/m, 1050 μ F, ancho de pulso 34-37 ms) de un pulsador Eurjectch Easyject. Posteriormente, se incubaron las células en placas de cultivo tisular de seis pocillos en medio TC completo complementado con 100 ng/ml de hIL4 recombinante.

[0318] Se prepararon extractos celulares mediante un procedimiento de congelación y descongelación 24, 48 y 72 horas después de la transfección. Las células KBT y PBML no transfectadas se usaron como control negativo y control positivo, respectivamente. El contenido de proteína total de los extractos celulares se determinó usando el ensayo de proteína Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad). Se inmunoprecipitaron cantidades iguales de extractos celulares (aproximadamente 2 mg) con 3 μ g de cadena anti-hIL4-R α (BD Pharmingen 551894) usando 20 mg de proteína A insolubilizada en flujo rápido de Sefarosa 4B (Sigma). Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces en

tampón de dilución (Triton X-100 al 0,1 % y hemoglobina bovina en solución de TSA, una vez en solución de TSA y otra en solución de TRIS-Cl 0,05 M (pH 6,8) solubilizada con tampón Laemmli, se hirvieron y se redisolviéron mediante SDS-PAGE de TRIS-glicina del 4 % al 12 %. La solución de TSA contenía TRIS-Cl 0,01 M (pH 8,0), NaCl 0,14 M y azida sódica al 0,025 %). En algunos experimentos, 75 µg de contenido de proteína de los extractos 5 celulares se redisolviéron directamente mediante SDS-PAGE sin inmunoprecipitación previa.

[0319] Se realizaron análisis de transferencia Western transfiriendo las proteínas de geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham) a 25 V durante 2 horas en el tampón TRIS-glicina que contenía TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 %, vanadato de sodio 100 µM y metanol al 20 %. Las 10 transferencias se trataron durante 1 hora con tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 2,5 %, TRIS-Cl 10 mM [pH 7,5], NaCl 100 mM y Tween 20 al 0,1 %) y después se incubaron con 2 µg/ml de anticuerpo hIL4-Rα de ratón en tampón de bloqueo durante otra hora. La unión del anticuerpo se detectó incubando las transferencias durante 1 hora con anti-inmunoglobulina de ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante, seguida de una incubación de 1 minuto con sustrato yodado y después detección por quimioluminiscencia potenciada.

15

Resultados

[0320] La Figura 37 muestra un análisis por transferencia Western de extractos celulares de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado de KBT transfectada transitoriamente con cadena hIL4-Rα, 24, 48 y 72 horas después de la 20 transfección. La cadena hIL4-Rα se detectó en células KBT transfectadas con cadena hIL4-Rα 24 horas después de la transfección y los niveles de expresión de la cadena hIL4-Rα aumentaron progresivamente 48 y 72 horas después de la transfección. Las células KBT no transfectadas sirvieron como control negativo para la cadena hIL4-Rα. Los extractos celulares de células PBML humanas utilizadas para la preparación de ADNc de hIL4-Rα sirvieron como control positivo para la cadena hIL4-Rα.

25

9.2.2. Transfección estable

[0321] Como ejemplo de transfección estable de células de una estirpe celular tri-híbrida de linaje cruzado con una 30 proteína deseada, las células de una estirpe celular KBT se transfectaron con el gen de la interleucina 2 (hIL-2) humana.

Método

[0322] Se usó el vector de expresión hIL-2 pBC12/RSV/IL2 (IS) que contenía un gen de preproinsulina II de rata 35 bajo el control de secuencias de repetición terminales largas de RSV para la transfección. Se han incorporado la región líder de la insulina completa y las secuencias de insulina que codifican un codón de inicio de la traducción. Este ARNm de hIL-2 quimérico produce significativamente más proteína hIL2 que el ARNm de hIL-2 que contiene el líder natural de hIL-2 y el codón de iniciación (Cullen, 1988).

40 [0323] Las secuencias del gen de la dihidrofolato reductasa (dhFr) se insertaron en el vector pBC12/RSV/IL2 mediante ligadura con el fragmento del gen VS40/dhFr (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1: 854, 1981) dando como resultado el plásmido pBC12/RSV/IL-2/dhFr que contenía un gen dhFr murino completo bajo el control del promotor de la región temprana del virus VS40 y en el que los genes hIL-2 y dhFr se posicionaron en la misma orientación.

45 [0324] Antes de la transfección, las células KBT cultivadas se sometieron a mutagénesis con 0,1 mM del hidrocarburo aromático policíclico racémico 3a,4b-dihidroxi-1a,2a-epoxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[c]fenantreno (B[c]PHDE) durante 90 minutos (Carothers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5464-68, 1990). La selección de los clones de dhFr se basó en la dependencia de la hipoxantina y la timidina y siguió un período de expresión de 6 días (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 (7): 4216-20, 1980). Las células KTB deficientes en dhFr (KBTdhFr-) 50 resultantes se mantuvieron en medio convencional complementado con hipoxantina 10^{-4} M y timidina 10^{-5} M.

[0325] En la transfección, las células KBTdhFr- cultivadas se lavaron con PBS tres veces y se resuspendieron en 0,8 ml de PBS. Se añadieron 60 µg de vector pBC12/RSV/IL2/dhFr a la suspensión celular y la suspensión se transfirió a una cubeta de electroporación de plástico y se incubó en hielo durante 10 min. La electroporación se 55 realizó a 75 kV/m y 25 µF usando un protocolo de electroporación convencional con una unidad de electroporación de pulsos genéticos (Bio-Rad). Después de pulsar, la cubeta se incubó en hielo durante 10 min. Las células se transfirieron después a los matraces y se cultivaron en medio convencional sin hipoxantina y timidina. Las células supervivientes se clonaron usando una técnica de clonación de una célula individual (véase la Sección 1.1.2) y las estirpes establecidas se evaluaron para determinar la secreción de hIL-2.

60

Resultados

[0326] La expresión del ARNm de hIL-2 en células KBT transfectadas (KBT TR-IL2) se verificó mediante PCR con cebadores específicos de hIL-2. Los linfocitos T CD8⁺ humanas obtenidos de PBML a través de la clasificación de 65 perlas magnéticas (como se ha descrito en la Sección 1.3.3.5) y la estirpe celular Jurkat, Clon E6-1 se usaron como

control positivo. Se usaron células K562 y células híbridas KBT no transfectadas como controles negativos. El ARN total se extrajo de las células KBT transfectadas después de varios tratamientos en el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los siguientes cebadores fueron los cebadores hIL-2 utilizados basándose en las secuencias publicadas (Wang et al, 1989):

5

cebador 5' = 5'-GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC-3' (SEQ ID NO: 13)

cebador 3' = 5'-TGTTTCAGATCCCCTTTAGTTCCAG-3' (SEQ ID NO: 14)

La amplificación se realizó durante 35 ciclos. Los ciclos de PCR consistieron en 40 segundos a 94 °C, la temperatura de hibridación para hIL2 fue de 55 °C, seguida de una extensión durante 40 segundos a 72 °C. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. Los resultados se proporcionan en la Figura 38. Los niveles de expresión son similares a los obtenidos a partir de linfocitos T humanos CD8⁺ y células Jurkat. Se usaron células KBT no transfectadas y células K562 como controles negativos.

15 **[0327]** La IL-2 intracelular se detectó usando el kit de detección de IL-2 intracelular BD FastImmune™ CD4 (BD Pharmingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los análisis por FACS se realizaron usando un BD FACSCalibur. Inicialmente, las células CD4⁺ se clasificaron según la dispersión directa y el umbral de fluorescencia, así como la dispersión frontal y lateral. Le siguió el análisis de la población seleccionada basada en CD69 (linfocitos T CD4⁺ activados) y la expresión de IL-2 intracelular. En la Figura 39 se muestra un perfil de FACS de la expresión de IL-2 en las células KBT TR-IL2. Se usaron células KBT no transfectadas como control. Aproximadamente el 41 % de las células KBT fueron positivas para la molécula de activación de CD69. El 92 % de las células KBT TR-IL2 se tiñeron de forma positiva para hIL-2 intracelular (R1⁺ R2). Las células negativas para hIL-2 eran parte de la población positiva para CD69, mientras que las células negativas para CD69 eran todas positivas para hIL2 intracelular.

25 **[0328]** Las secreciones de hIL-2 treinta días y noventa días después de la transfección se verificaron mediante ELISA. En resumen, se incubaron 1x10⁶ células KBT transfectadas con 6hIL en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a 37 °C durante 24 horas. Se recogió el sobrenadante y se midió la actividad de hIL-2 con el kit ELISA de hIL-2 (R&D systems). Los sobrenadantes se diluyeron para ajustarse al intervalo de detección del kit ELISA de hIL-2. Se usó hIL-2 recombinante (R&D systems) como control positivo. El análisis de ELISA mostró velocidades de secreción de hIL-2 que variaban de 660 ng/10⁶ células/24 horas a 3300 ng/10⁶ células/24 horas.

30 **[0329]** La estirpe de células KBT resultante, transfectada de forma estable con hIL2 y que secretaba hIL2, se etiquetó como ProL2.

35 9.3. Expresión simultánea de proteínas diana combinando hibridación y transfección

[0330] Como ejemplo de expresión de proteína simultánea usando el sistema tri-híbrido, las células tri-híbridas se hibridaron con linfocitos sIgM⁺ CD25⁺ B humanos para expresar hIgM, seguido de una transfección estable con hIL-2. El sistema de células híbridas que expresaba de forma estable tanto hIgM como hIL-2 se sometió adicionalmente a transfección transitoria con hIL-4R α . En este ejemplo, hIgM representó la primera proteína, hIL-2 representó la segunda proteína expresada simultáneamente y hIL-4R α representó la tercera proteína expresada simultáneamente. Como alternativa, las células tri-híbridas se transfectaron de forma estable con hIL-2, seguido de hibridación de células somáticas con células B shigM⁺ CD25⁺ humanas. Tras la confirmación de que tanto hIL-2 como hIgM se expresaban a partir del sistema celular híbrido, el sistema celular híbrido se sometió a una transfección transitoria con hIL-4R α . En este ejemplo, hIL-2 representó la primera proteína, hIgM representó la segunda proteína expresada simultáneamente y hIL-4R α representó la tercera proteína expresada simultáneamente.

9.3.1. Preparación de células

50 **[0331]** Se usó en estos experimentos el tri-híbrido de linaje cruzado de KBT derivado de células B maduras (CD19⁺) y de linfocitos T auxiliares maduros (CD4⁺) con el 100 % de células tri-híbridas de linaje cruzado que compartían marcadores fenotípicos de células B y T según se determinó por FACS (véase la Sección 4.2.3) y cariotipado como se ha descrito en la Sección 6.2.1. En algunos casos, en los experimentos se usaron células KBT deficientes en dhFr (KBTdhFr-) derivaron del proceso de mutagénesis descrito en la sección 9.2.2 y se mantuvieron en medio convencional complementado con hipoxantina 10⁻⁴M y timidina 10⁻⁵M. Además, en algunos casos también se usó la estirpe celular transfectada con hIL-2 KBT TR-IL2 (véase la Sección 9.2.2). Se usaron células B positivas primarias sIgM activadas por CD40 aisladas de PBMC como se ha descrito en la Sección 1.3.3 y activadas a través de la vía CD40, como se ha descrito en la Sección 2.2, como fuente de células sIgM B humanas para la hibridación. Para estos experimentos particulares, el aislamiento de células B sIgM⁺ también se basó en la expresión de superficie simultánea de CD25

60 **[0332]** (receptor de IL-2 humano) usando FACS después de 5 días en el cultivo. Se aislaron linfocitos T CD8⁺ de los timos usando el kit MACS CD4 Multisort como se ha descrito en la Sección 1.3.3.5.

65 9.3.2. Hibridación de células somáticas para la producción de una primera proteína o coproducción de una

segunda proteína

[0333] El procedimiento de hibridación celular eléctrica entre una célula KBT o una célula KBTdhFr- o estirpe celular KBT TR-IL2 y células B shlgM⁺ CD25⁺ (subconjunto de células B de memoria) fue esencialmente el mismo que el utilizado para la creación de estirpes de tri-híbrido de linaje cruzado de KBT como se ha descrito en la Sección 4.4.2. Una vez que los híbridos resultantes se estabilizaron, se mantuvieron como se ha descrito en la Sección 1.1. La coexpresión de shlgM y CD25 por el híbrido resultante se verificó a través del análisis por FACS (véase la Figura 62) y la producción de hlgM se analizó mediante ELISA. En los casos en que se usaron células KBT TR-IL2 para la hibridación con células B shlgM⁺ CD25⁺, la producción de hIL-2 también se analizó al mismo tiempo que hlgM.

9.3.3. Transfección estable con la segunda proteína

[0334] Cuando se realizó la hibridación de células somáticas antes de la transfección estable del sistema con hIL-2, el sistema productor de hlgM se sometió a transfección con hIL-2 usando la metodología descrita en la sección 9.2.2. La producción simultánea de hlgM y hIL-2 se verificó mediante ELISA.

9.3.4. Transfección transitoria con la tercera proteína

[0335] Un sistema híbrido estable que secretaba tanto hlgM como hIL-2 se transfectó de manera transitoria a través de la electroporación con el gen hIL-4Ra, usando el mismo método descrito en la Sección 9.2.1. La coproducción de hlgM, hIL-2 y hIL-4Ra se confirmó mediante ELISA.

Resultados

[0336] Los niveles de producción de tres proteínas expresadas simultáneamente y coproducidas por las células del mismo sistema celular híbrido se resumen en la Tabla 7a y la Tabla 7b. Para el análisis, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta la densidad de $0,5 \times 10^5$ células/ml para la expresión de una proteína, $1,2 \times 10^5$ células/ml para la expresión de dos proteínas y $3,2 \times 10^5$ células/ml para la expresión de tres proteínas. El sistema no solo fue capaz de producir tres proteínas simultáneamente, sino que también aumentó el nivel de producción de la primera proteína después de la coexpresión de la proteína secundaria y aumentó adicionalmente por la expresión de la tercera proteína. De la misma manera, la producción de la segunda proteína aumentó por la expresión de la tercera proteína.

Tabla 7a. Niveles típicos de producción de proteínas expresadas simultáneamente por el mismo sistema de células híbridas, siendo el primer método de expresión la hibridación somática

Nivel de producción	Expresión de una proteína	Expresión de dos proteínas	Expresión de tres proteínas
hlgM. ng/ml/24 horas	3.382 ± 284	12.547 ± 593	33.891 ± 835
hIL-2. ng/ml/24 horas		18.524 ± 660	74.012 ± 1.034
hIL-4Ra. ng/ml/24 horas			13.892 ± 791

Tabla 7b. Nivel de producción típico de proteínas expresadas simultáneamente por el mismo sistema de células híbridas, siendo el primer método de expresión la transfección estable

Nivel de producción	Expresión de una proteína	Expresión de dos proteínas	Expresión de tres proteínas
hIL2, ng/ml/24 horas	3.228 ± 284	19.875 ± 843	81.124 ± 1.435
hlgM, ng/ml/24 horas		5.321 ± 476	18.067 ± 613
hIL-4Ra, ng/ml/24 horas			12.766 ± 897

Ejemplo 10**10. Adaptación a condiciones de cultivo sin suero para la producción del híbrido ProGM**

[0337] Con el fin de demostrar la robustez del híbrido ProGM para la producción comercial, el volumen de cultivo se amplió a matraces giratorios con un volumen de trabajo de 1,2 l y se adaptó el cultivo a un ambiente sin suero.

Metodología

[0338] Los clones de mayor producción de hGM-CSF de híbridos de ProGM se adaptaron para crecer en un ambiente sin suero mediante la reducción gradual del contenido de FCS al 7,5, 5,0, 2,5, 1,0, 0,5 y 0 %. Solo los subcultivos que mostraron el crecimiento celular más robusto y la producción de hGM-CSF anterior se transfirieron a los entornos séricos inferiores consecutivos. Cada subcultivo seleccionado se congeló en el medio convencional de los presentes inventores con DMSO al 5 % para almacenamiento. Se usaron dos medios de cultivo sin suero con fines de adaptación. Se usaron medios libres de proteínas y suero definidos disponibles en el mercado Hybri-Max

(Sigma) o Excel (JHR) con algunas modificaciones. La viabilidad celular se evaluó mediante exclusión con azul de tripano el día 7. La concentración de hGM-CSF se determinó mediante ELISA el mismo día.

Resultados

5

[0339] Los resultados de la adaptación a las condiciones de cultivo sin suero se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8. Producción de hGM-CSF por ProGM en condiciones sin suero

	Contenido de suero (%)						
	10,0	7,5	5,0	2,5	1,0	0,5	0
Máxima densidad celular ($\times 10^6$ células/ml)	1,8	1,0	1,0	0,8	0,6	0,5	0,5
Concentración de hGM-CSF ($\mu\text{g/ml}$)	0,911	1,431	1,412	2,345	3,971	4,231	3,825
Producción ($\mu\text{g/ml}/10^6$ células)	0,5	1,431	1,412	2,93	6,62	8,46	7,65

10 **[0340]** En todos los subcultivos de ProGM híbrido, la producción de hGM-CSF aumentó con la reducción del contenido en suero y proteínas. A pesar de la baja densidad celular en cultivos sin suero, la cantidad de hGM-CSF en el medio sin suero fue aproximadamente 4 veces superior a la obtenida en condiciones de cultivo convencionales. Cuando se normalizó a la concentración celular, la velocidad de producción de hGM-CSF aumentó 15 veces.

15

Ejemplo 11

11.1. Producción en matraces giratorios

20 Metodología

[0341] Se agitaron matraces giratorios con un volumen de trabajo de 1,2 l a 50 rpm. Las células híbridas ProGM adaptadas al crecimiento en un entorno sin suero (ProGMsf) se inocularon a una concentración de 1×10^5 células/ml. El cultivo se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. La densidad celular máxima alcanzada fue de 5×10^5 células/ml. Las células viables se determinaron usando el método de exclusión con azul de tripano. Se realizaron cambios diarios de medio durante hasta 9 días. La suspensión celular (600 ml) se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, el medio se retiró y se reemplazó por medio recién preparado y las células se devolvieron al matraz de centrifugación. La concentración de hGM-CSF secretada se determinó mediante ELISA. Cada pocillo se recubrió con 100 μl de anti-GM-CSF humano de rata (R&D) diluido 1:500. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % v/v (PBS-T), se añadieron 100 μl de rhGM-CSF convencional (Invitrogen) en PBS-5 % v/v BSA, en el intervalo de 0,195-200 ng/ml o muestras de 100 μl cada una diluida 100 veces a los pocillos por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se añadieron 100 μl de anticuerpo anti-GM-CSF humano de conejo (R&D) diluido 1:1.000 en PBS-BSA-T y, después de la incubación y el lavado, se añadieron 100 μl de anti-inmunoglobulinas de conejo de cabra conjugadas con HRRP diluidos 1:1.000 en el mismo tampón. Una vez más, las placas se incubaron y se lavaron y se añadieron 100 μl de sustrato. Las densidades ópticas se midieron a 450 nm.

Resultados

40 **[0342]** La densidad celular relativamente baja de 5×10^5 células por ml indica condiciones de cultivo subóptimas para el crecimiento celular de ProGMsf. Puede requerirse una optimización adicional de las condiciones de cultivo que incluyan un contenido de glucosa y otros complementos para obtener densidades más altas (en el orden de 10^6 células/ml). También se justifica una estrecha vigilancia del contenido de lactato y amonio. A pesar del crecimiento subóptimo, la concentración de hGM-CSF en los sobrenadantes de cultivo osciló entre 2,8 y 4,2 μg por ml. Cuando se normalizó con la densidad de células y el tiempo, ProGMsf presentó velocidades de producción de entre 0,6 a 0,9 μg de hGM-CSF por ml por cada 10^6 células durante 24 horas. Para comparación, una producción de 0,3 μg de proteína por ml por 10^6 células durante 24 horas en células CHO se considera alta.

50

11.2. Purificación de GM-CSF humano producido por la estirpe celular híbrida ProGM

Metodología

[0343] El sobrenadante del cultivo de ProGMsf se concentró aproximadamente 10 veces a 40 °C con una membrana PM-10 (Amicon). El concentrado de muestra se cargó en una columna de inmovilización, preparada mediante el acoplamiento de GMCSF antihumano de rata contra GM-CSF humano derivado de *E. coli* a Affi-Gel 10 (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo del fabricante, equilibrado con PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) y las proteínas unidas se eluyeron con citrato de sodio 1 mM, pH 2,8. Las proteínas eluidas de la columna de afinidad se cargaron después en la columna de HPLC RP 300 y se eluyeron con un gradiente de

55

acetónitrilo del 0-60 % durante 60 minutos a un caudal de 0,1 ml/min. El perfil de elución resultante se muestra en la Figura 40. Se recogieron alícuotas recuperadas de RP-HPLC para ELISA, tinción con plata y análisis por transferencia Western.

5 Resultados

[0344] La Tabla 9 muestra la recuperación de hGM-CSF a partir de la purificación típica en dos etapas. La recuperación inicial de la columna de afinidad fue solo del 59 % y solo el 2 % de hGM-CSF se perdió después de la RPHPLC. Hay varias posibilidades que explican la baja recuperación después de la purificación por afinidad. La capacidad de unión de la columna de afinidad podría ser inferior a la cantidad de hGM-CSF en los sobrenadantes de ProGMsf, ya que el 13 % de hGM-CSF se perdió en las etapas de paso de flujo y lavado. La baja recuperación también podría deberse a una menor afinidad de los anticuerpos de rata producidos contra hGM-CSF derivado de *E. coli* en comparación con las formas glucosiladas de hGM-CSF producidas por el híbrido ProGMsf. La otra mejora potencial en los rendimientos finales sería el desarrollo de unas condiciones de elución mejor optimizadas. En la Figura 41 (véase la Sección 12), la transferencia Western de las fracciones recogidas después de RP-HPLC demostró que hGM-CSF eluyó en las fracciones 24-36 (eluyendo a los 24-36 minutos). Las formas de alto peso molecular (28-32 kDa) eluyeron en las fracciones 24 a 27, mientras que las moléculas de menor peso molecular (18-22 kDa) eluyeron en las fracciones 34 a 36. Estas condiciones cromatográficas no resolvieron completamente las diferentes formas de peso molecular del hGM-CSF, especialmente en las fracciones de peso molecular medio y alto.

[0345] El perfil obtenido con la tinción con plata y los perfiles de transferencia Western fueron esencialmente idénticos, lo que sugiere que solo las proteínas relacionadas con hGM-CSF se unen a la columna de afinidad. Se observaron varias especies de peso molecular de hGM-CSF nativo.

25 **Tabla 9. Purificación en dos etapas del hGM-CSF derivado de ProGMsf**

Muestra	Volumen	Concentración de hGM-CSF por ELISA	Total de hGM-CSF en la muestra	Rendimiento
	ml	µg/ml	µg	%
Sobrenadante de ProGMsf	60	3,825	229,5	100
Flujo de paso de la columna de afinidad	60	0,467	28,02	12
Etapas de lavado	10	0,112	1,12	0,5
Eluato	3	44,78	134,34	59
Fracciones positivas para el inmunoensayo por RP-HPLC				
24	0,1	144,5	14,45	6,3
25	0,1	159,7	15,97	7,0
26	0,1	102,8	10,28	4,5
27	0,1	123,1	12,31	5,4
28	0,1	163,6	16,36	7,0
29	0,1	146,8	14,68	6,0
30	0,1	71,72	7,172	3,0
31	0,1	144	1,324	0,6
32	0,1	9,38	0,938	0,4
33	0,1	10,72	1,072	0,5
34	0,1	184,6	18,46	8,0
35	0,1	161,3.3	16,16	7,0
36	0,1	19,71	1,971	0,9
Total			131,15 57	
Rendimiento total				57

Ejemplo 12

12. Digestión por glucosidasa

30

Metodología

[0346] Se desnaturalizó térmicamente GM-CSF purificado humano derivado del híbrido ProGMsf durante 3 minutos a 100 °C en SDS al 1 %, P-mercaptoetanol 1 M, fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0, se añadieron 0,8 U de PNGasa F de calidad de secuenciación (Sigma) se incubaron en períodos crecientes a 37 °C.

35

Resultados

[0347] Como se observa en la Figura 43 después de la digestión con N, las formas de hGM-CSF derivadas del híbrido ProGMsf migraron de manera dependiente del tiempo a la posición cercana al hGM-CSF derivado de *E. coli*. Sin embargo, ninguna de las bandas después de la digestión correspondió a la forma no glucosilada producida por *E. coli*. Estos resultados sugieren que el hGM-CSF derivado del híbrido ProGMsf está glucosilado en ambos sitios de glucosilación N y O y que la distribución de peso molecular está provocada por la glucosilación heterogénea. Este hallazgo de O-glucosilación en todas las moléculas de hGM-CSF es importante desde el punto de vista de la inmunogenicidad de los sitios de O-glucosilación no protegidos; se ha notificado que el GM-CSF humano recombinante que carece de O-glucosilación desarrolló anticuerpos en ensayos clínicos.

[0348] Los datos sugieren que las células híbridas ProGMsf secretan tres clases de hGM-CSF de acuerdo con los sitios de N-glucosilación: moléculas con ambos sitios glucosilados (25-35 kDa, tipo 2N); moléculas con cualquier sitio glucosilado (20-25 kDa, tipo 1N); y moléculas sin ningún sitio glucosilado (18-20 kDa, tipo ON).

Referencias**[0349]**

- 20 Ainaï et al., *Hum Antibodies* 15: 139-154, 2006
 Airoldi et al, *Cancer Research* 61: 1285-1290, 2001
 Blackwood et al, *Science* 281: 60-63, 1998
 Boerner et al, *J. Immunol.* 147: 86-95, 1991;
 Carothers et al, *Proc. Natl. Acad. Sci* 87: 5464-68, 1990
 25 Christensen et al *J Biol. Chem.* 282(27): 19463-19472
 Cullen, B. R., 1988. *DNA*, 7: 645-650
 Durocher et al, *Nucleic Acids Res* 30(2): e9, 2002;
 Durocher et al, *Nucleic Acids Res* 30(2): e9, 2002;
 Feizi *Nature* 314: 53-54, 1985;
 30 Girard et al, *Cytotechnology* 38: 15-21, 2002;
 Gramer et al, *Biotechnology* 13 (7): 692, 1995
 Hartman et al, *J Immunol* 164: 944-953, 2000;
 Hosoi et al, *Cytotechnology* 7: 25-32, 1991
 Hosoi et al, *Cytotechnology* 7: 25-32, 1991
 35 Hosoi et al, *Cytotechnology* 7: 25-32, 1991
 Hur et al, *Cell Prolif* 38: 35-45, 2005;
 Jordan et al, *Cytotechnology* 26: 39-47, 1998;
 Jordan et al, *Cytotechnology* 26: 39-47, 1998;
 Kalantarov et al, *Hum Antibodies* 11: 85-96, 2002;
 40 Karpas et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1799-1804, 2001
 Kimura H. et al, 1999. *J Clin Microbiol* 37: 132-136
 Kirman et al, *Hybrid. Hybridomics* 21: 405-414, 2002;
 Kohler, G y Milstein, C. *Nature*, 256, 495-497 1975
 Li et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10): 3557-3562, 2006
 45 Li et al, *Proc Ntl Acad Sci USA* 95: 3650-3654, 1998;
 Mahaworasilpa, T. L. (1992). *Cell Electro-Dynamics: The mechanics of living cells in intense alternating electric fields. PhD Thesis*, University of New South Wales, Sydney, Australia
 Marika et al, *Curr Opin Genet Dev* 11(2): 205-208, 2001
 Mclroy D, Autran B, Cheynier R, et al. *J Virol.*; 69: 4737-4745 1995
 50 Meissner et al, *Biotechnol Bioeng* 75(2): 197-203, 2001
 Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 173-180, 1990;
 Miyaji et al., *Cytotechnology* 4: 39-43, 1990;
 Miyaji et al, *Cytotechnology*, 3: 133-140, 1990;
 Neil, G. A. y Zimmermann, *U Electro, Meth. Enzymol* 220, 174 1993
 55 Parham et al, *Cytotechnology*, 35: 181-187, 2001
 Paulson et al, *J. Biol. Chem.* 264: 10931-10934, 1989
 Pham et al, *Biotechnol Bioeng* 84(3): 332-42, 2003
 Pohl, H. *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, London 1978
 Rademacher et al, *Annu Rev Biochem* 57: 785-838, 1988
 60 Satoh et al, *Cytotechnology* 18: 162-172, 1996
 Satoh et al, *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993
 Satoh et al, *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993
 Schlaeger et al, *Cytotechnology* 30: 71-83, 1999
 Shinkawa et al, *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473, 2003
 65 Sugimoto et al, *J Virol* 73: 9690-9691, 1999;

Toda et al, *J Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 787: 197-206, 2003.
 Traggiai et al, *Nat Med* 10: 871-875, 2004
 Urlaub et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77(7): 4216-20, 1980
 van Dijk et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 368-374, 2001
 5 Wang, A. M., Doyle, M. V. y Mark, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9717-9721, 1989
 Wojcieszyn, J. W. et al, *J. Cell. Biol.*, 96, 151-159, 1983
 Zafiroopoulos et al, *J. Immunol. Methods* 200: 181-190, 1997
 Zimmermann, U. (1982). *Biochim. Biophys. Acta.* 694, 227-277

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0350]

15 <110> Stephen Sanig Research Institute

<120> Métodos de generación de células híbridas

<130> 50356WOP00

20 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

30 cacactcgcc tgccctttcc 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

gattcccgtc cagtgtagg 20

40 <210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 3

caagaacca gacgagtcg tagaa 25

<210> 4

<211> 25

50 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

aagaagcatg tatactaagc ctccc 25

55 <210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 5

ccggaagggtg tatgaactg 19

<210> 6

65 <211> 19

ES 2 714 704 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 6
 5 tccatggtga tctctcctc 19

 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 7
 tgttcttcga cattgccgtc gac 23

 15 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 20 <400> 8
 gcatttgcca tggacaagat gccagga 27

 <210> 9
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 9
 aggggcgcgc agataattaa a 21
 30
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 10
 agtggggcca atcaccttca ta 22

 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 11
 45 ggatccgcgc agataattaa aga 23

 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*

 <400> 12
 ggatccaaat caccttcata ccat 24

 55 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 60 <400> 13
 gaatggaatt aataattaca agaatccc 28

 <210> 14
 <211> 24
 65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

tgttcagat cccttagtt ccag 24

5

REIVINDICACIONES

1. Una célula híbrida generada mediante la hibridación de:

- 5 una primera célula, en la que dicha primera célula es una célula derivada de una célula progenitora mieloide común, en la que una célula progenitora mieloide común es una progenie de una célula madre hematopoyética restringida al linaje mieloide y capaz de dar origen a cualquiera de los progenitores de megacariocitos/eritrocitos o de granulocitos/macrófagos, pero no a células linfoides;
una segunda célula derivada de una célula progenitora linfoide común; y
- 10 una tercera célula derivada de una célula progenitora linfoide común, en la que una célula progenitora linfoide común es una progenie de una célula madre hematopoyética restringida al linaje linfoide y capaz de dar origen a linfocitos B, T y citolíticos naturales, pero no a células mieloides,
en la que dicha segunda célula y dicha tercera célula no son una célula de mieloma,
y en la que dicha segunda célula es preferentemente una célula derivada del linaje linfoide B y
- 15 dicha tercera célula es preferentemente una célula derivada del linaje linfoide B o en la que dicha segunda célula es preferentemente una célula derivada del linaje linfoide T y dicha tercera célula es preferentemente una célula derivada del linaje linfoide T.

2. Una célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha segunda célula es una célula derivada del linaje linfoide B y en la que dicha célula derivada del linaje linfoide B es preferentemente una célula pre-B, una célula B inmadura, una célula B indiferenciada, una célula B activada o una célula efectora B en la que dicha célula efectora es preferentemente una célula B con experiencia antigénica o una célula plasmática y dicha tercera célula es una célula derivada del linaje linfoide T en la que dicha célula derivada del linaje linfoide T es preferentemente un linfocito pre-T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T indiferenciado, un linfocito T activado o un linfocito T efector.

25 3. Una célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha célula derivada de una célula progenitora mieloide común se selecciona entre el grupo que consiste en un progenitor mielomonocítico, monocito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo, célula dendrítica o basófilo y en la que dicha célula derivada de una célula progenitora mieloide común es preferentemente una célula inmortalizada, en la que dicha célula inmortalizada deriva de una malignidad o de la realización de una acción en una célula que induce la capacidad de crecimiento indefinido, y/o deriva de bazo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea.

35 4. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 2 en la que dicha célula derivada del linaje linfoide B o del linaje linfoide T es una célula inmortalizada, en la que dicha célula inmortalizada deriva de una malignidad o de la realización de una acción en una célula que induce la capacidad de crecimiento indefinido, o en la que dicha célula derivada del linaje linfoide B o del linaje T linfoide deriva de tejido linfoide, tal como sangre periférica, sangre de cordón umbilical, bazo, médula ósea, timo, amígdalas, adenoides y ganglios linfáticos locales.

40 5. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que al menos una de las células es una célula humana o una célula de ratón.

6. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 3 en la que dicha célula derivada de una célula progenitora mieloide común es una célula K562.

45 7. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha segunda célula o dicha tercera célula es una célula WIL2-NS o una célula MOLT4.

8. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 2 en la que dicha célula derivada del linaje linfoide B es una célula WIL2-NS.

50 9. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 2 en la que dicha célula derivada de dicho linaje linfoide T es una célula MOLT4.

10. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula MOLT4, o en la que dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula B primaria y dicha tercera célula es un linfocito T primario, o en la que dicha primera célula es un monocito humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario, o en la que dicha primera célula es un progenitor mielomonocítico humano primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T humano primario, o en la que dicha primera célula es una célula K562, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es un linfocito T primario, o en la que dicha primera célula es un monocito primario, dicha segunda célula es una célula WIL2-NS y dicha tercera célula es una célula WIL2-NS.

65 11. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha célula híbrida expresa una proteína deseada, más de una proteína deseada, dos proteínas deseadas o tres proteínas deseadas en la que una o más de las

proteínas es una proteína endógena o una proteína recombinante y en la que dicha proteína es preferentemente una citocina, un factor estimulante de colonias, una interleucina, GM-CSF, interleucina 2, un receptor o fragmento de la misma, un receptor soluble, una cadena alfa del receptor de IL-4 humano, CD54 o una inmunoglobulina incluyendo IgM o IgG.

5

12. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha hibridación se consigue por medios eléctricos o por medios químicos.

10 13. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha célula híbrida se hibrida adicionalmente con una célula que expresa una proteína de interés o en la que dicha célula híbrida se enriquece para un marcador que define un tipo celular particular para permitir la expresión de una proteína que presente una modificación postraduccional o funcionalidad deseada.

15 14. La célula híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha hibridación se realiza mediante la hibridación de tres células individuales o en la que dicha hibridación se realiza usando tres poblaciones de células en las que cada una de dichas poblaciones incluye una pluralidad de tipos celulares idénticos.

20 15. Un método de producción de una proteína, comprendiendo dicho método la etapa de expresar una proteína en una célula híbrida de la reivindicación 1.

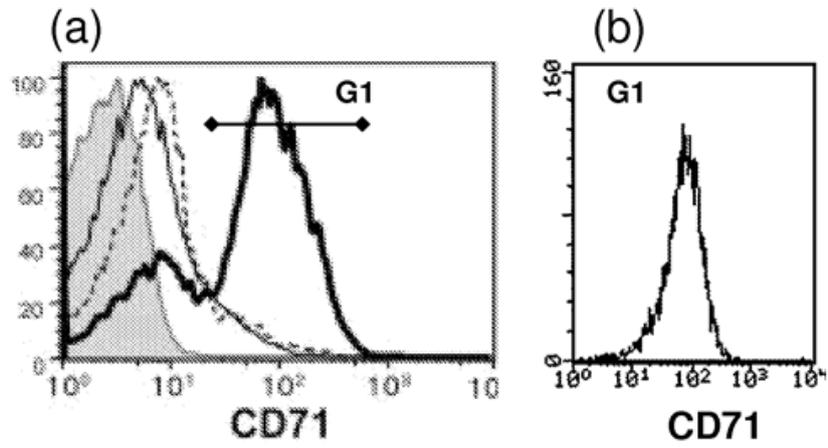


Figura 1.

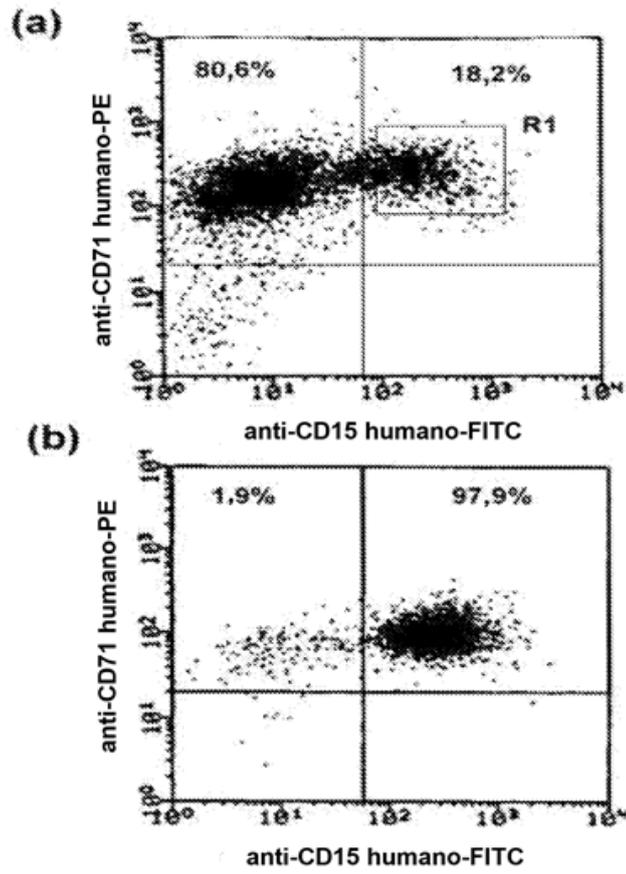


Figura 2.

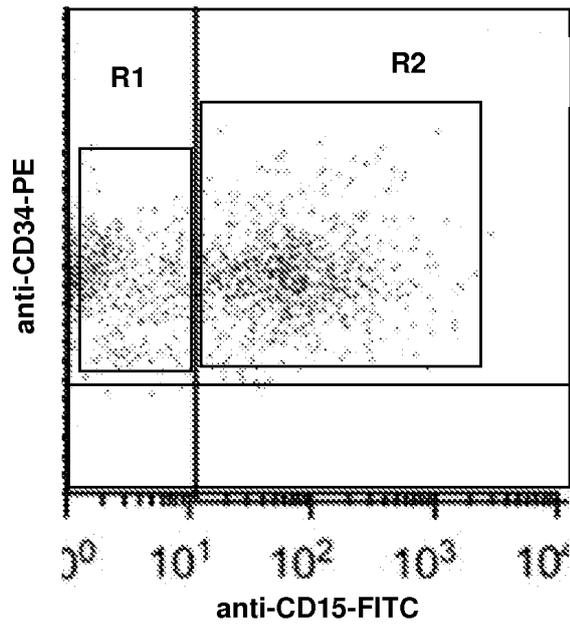


Figura 3.

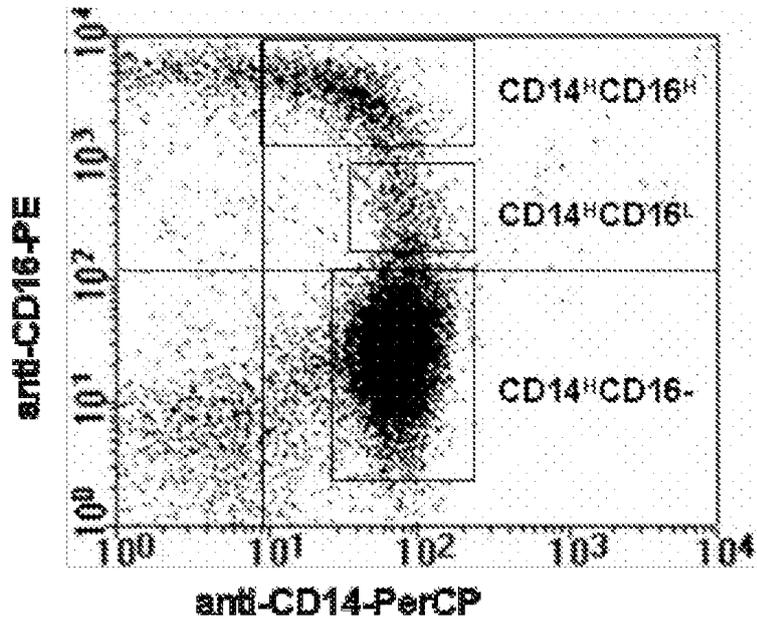


Figura 4.

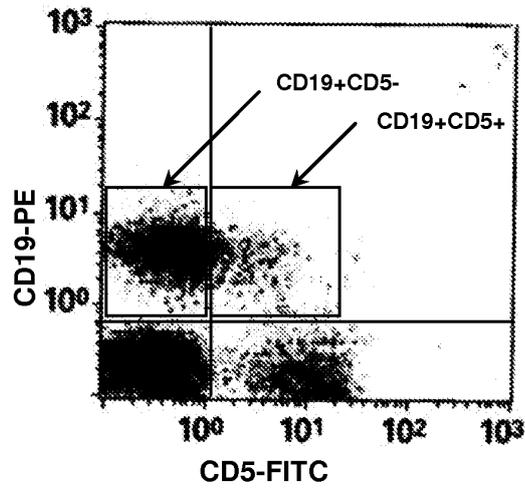


Figura 5.

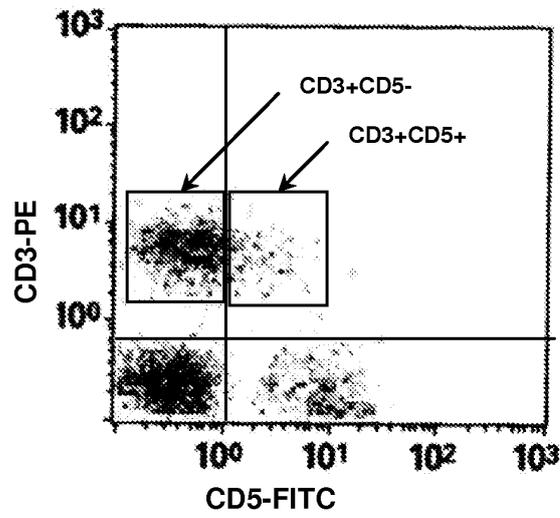


Figura 6.

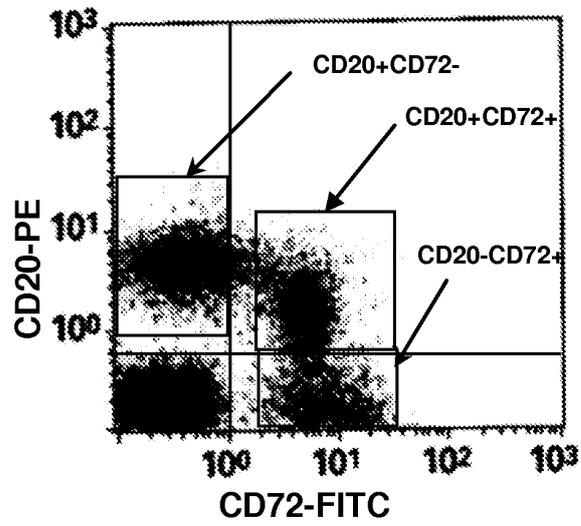


Figura 7.

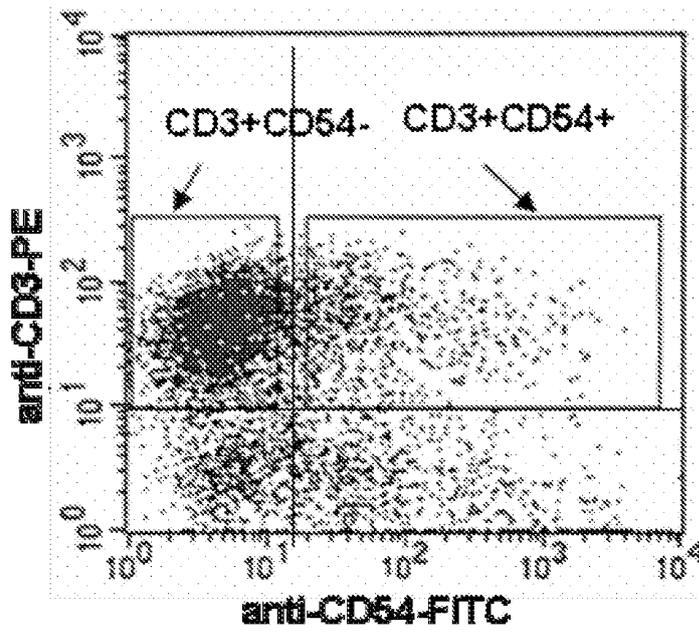
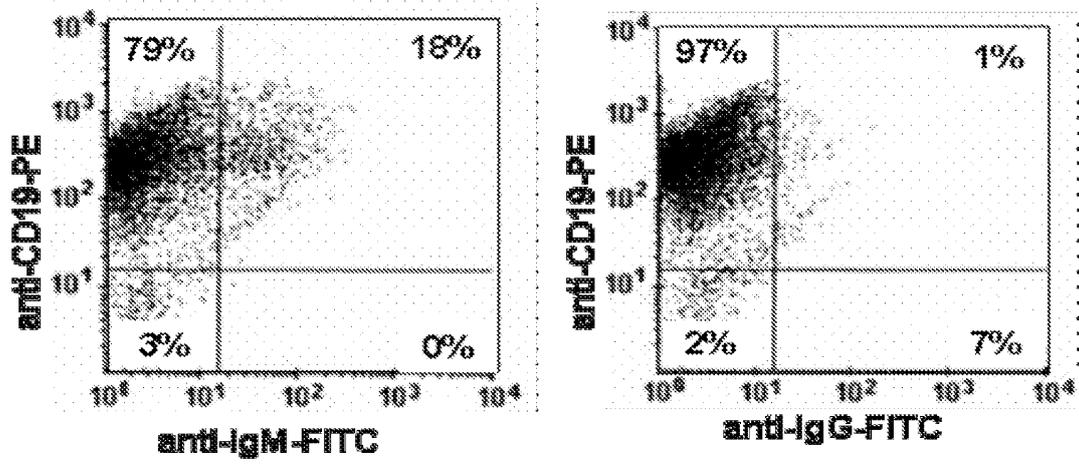


Figura 8.

(A) Día 5



(B) Día 10

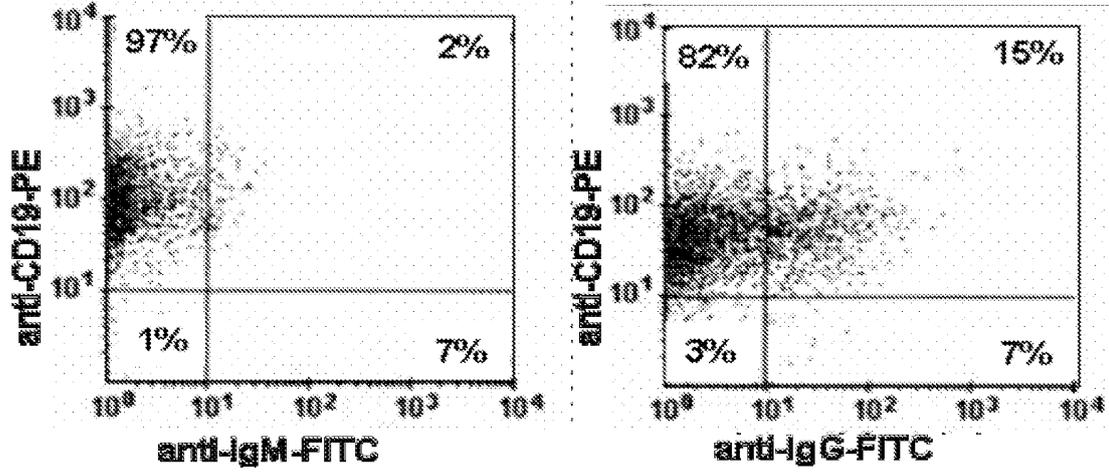


Figura 9.

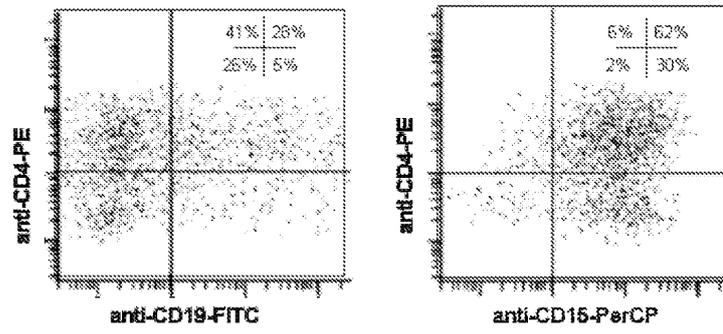


Figura 10.

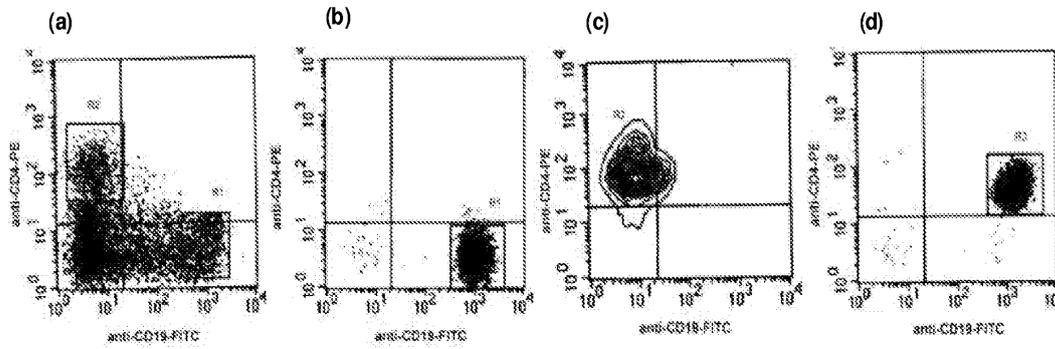


Figura 11.

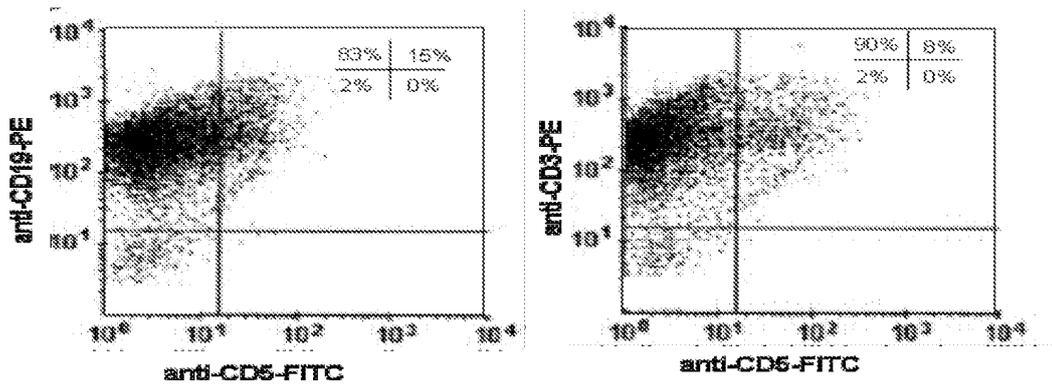


Figura 12.

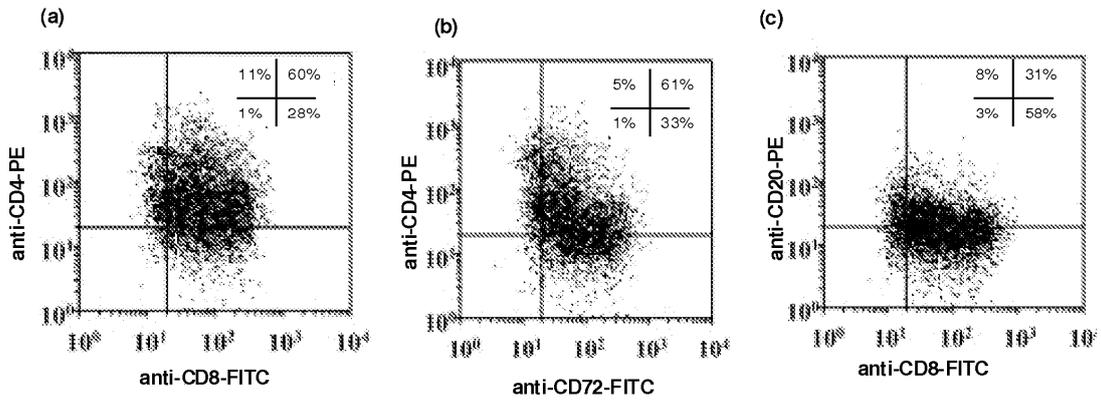


Figura 13.

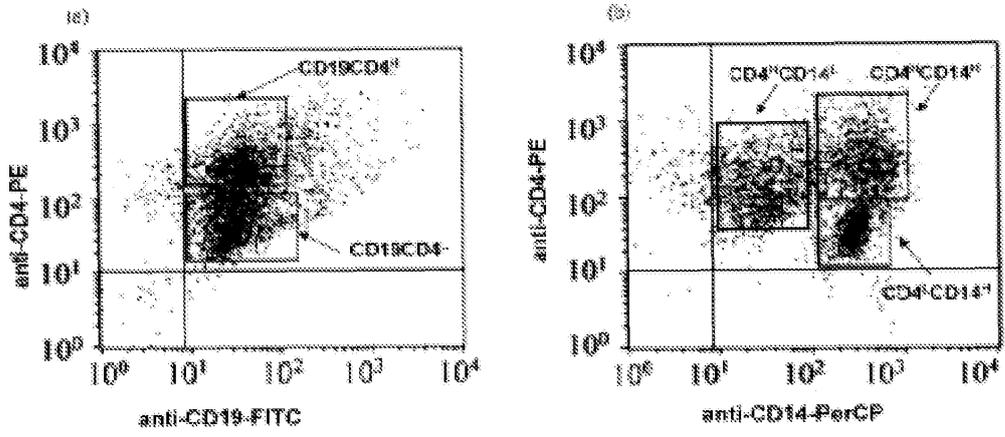


Figura 14.

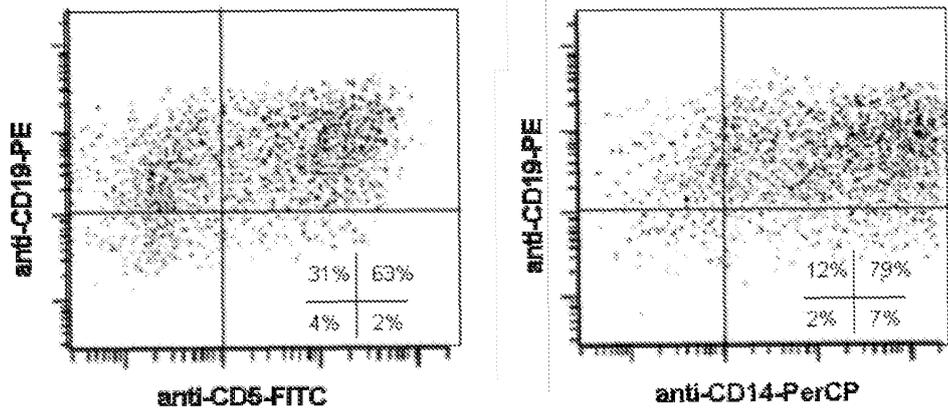


Figura 15.

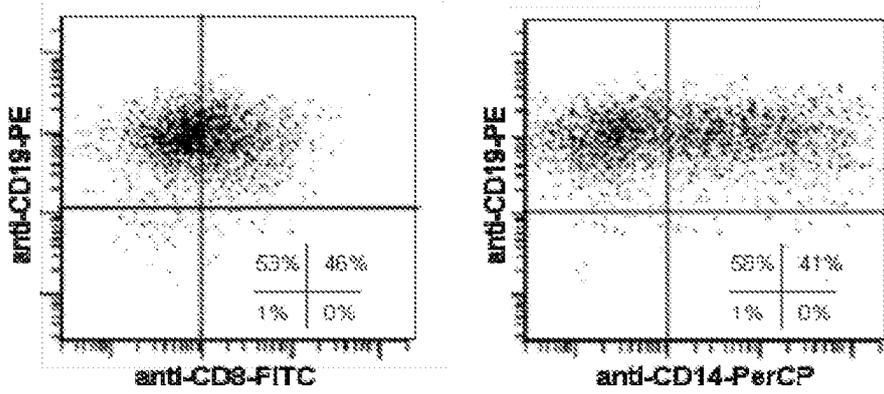


Figura 16.

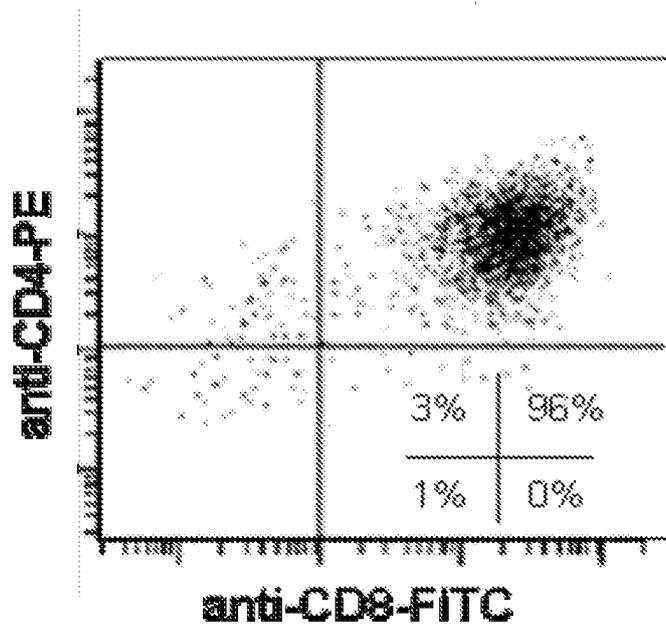


Figura 17.

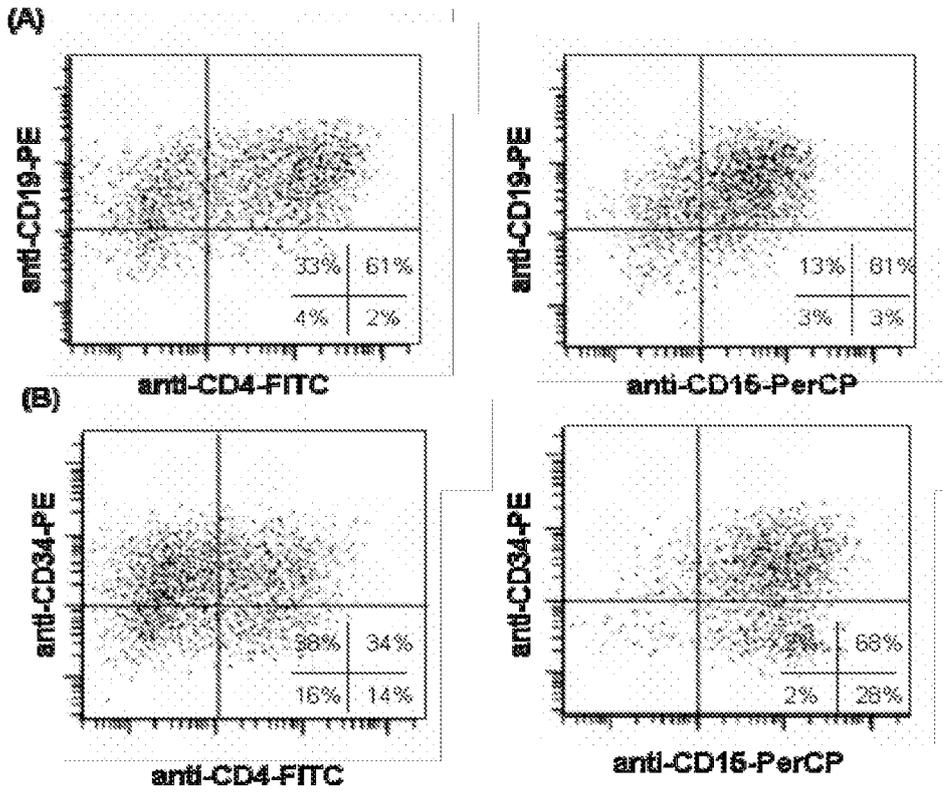


Figura 18.

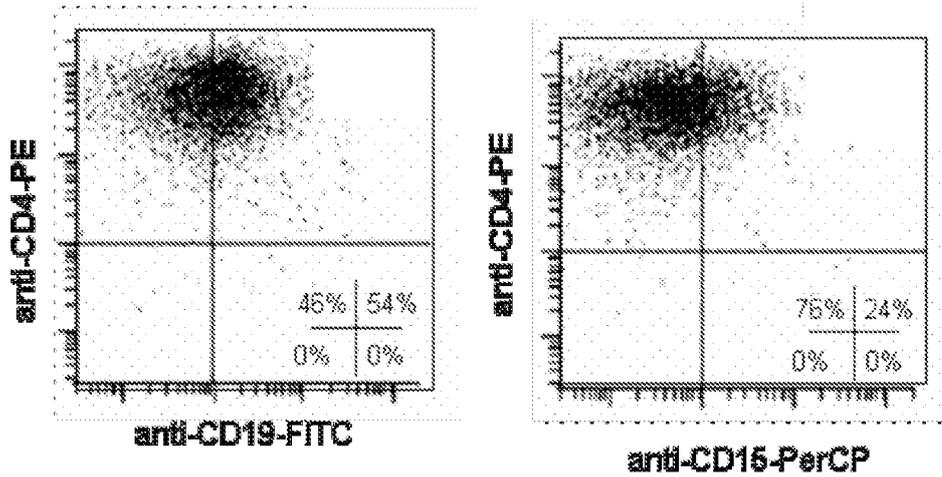


Figura 19.

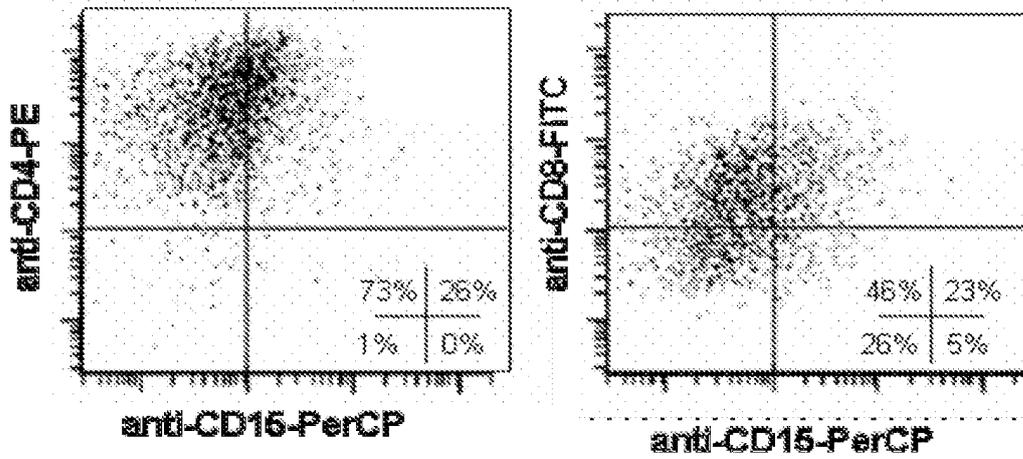


Figura 20.

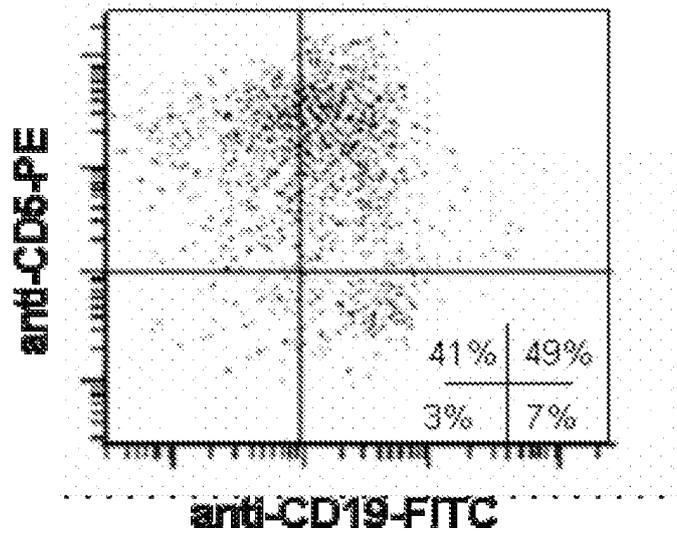


Figura 21.

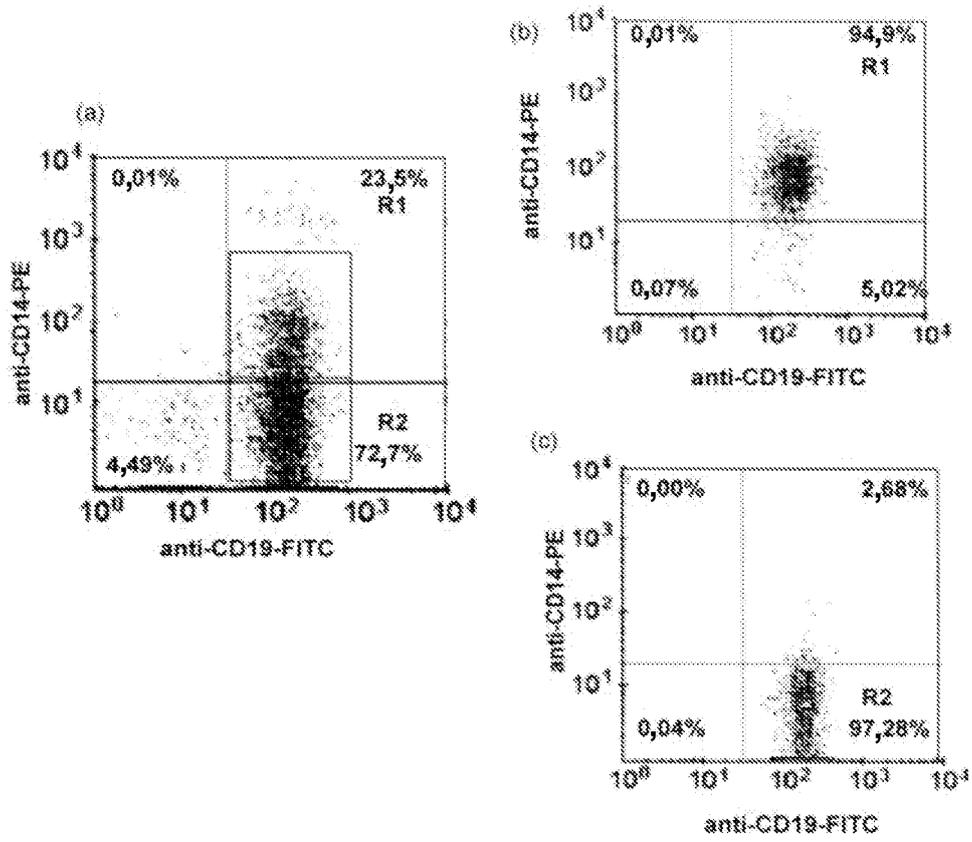


Figura 22.

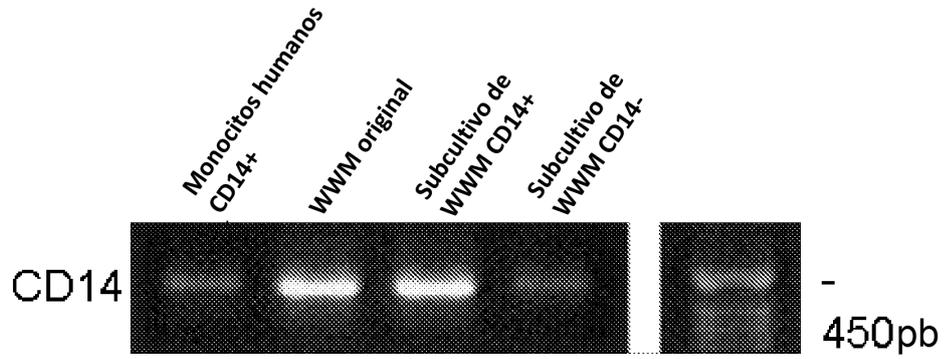


Figura 23.

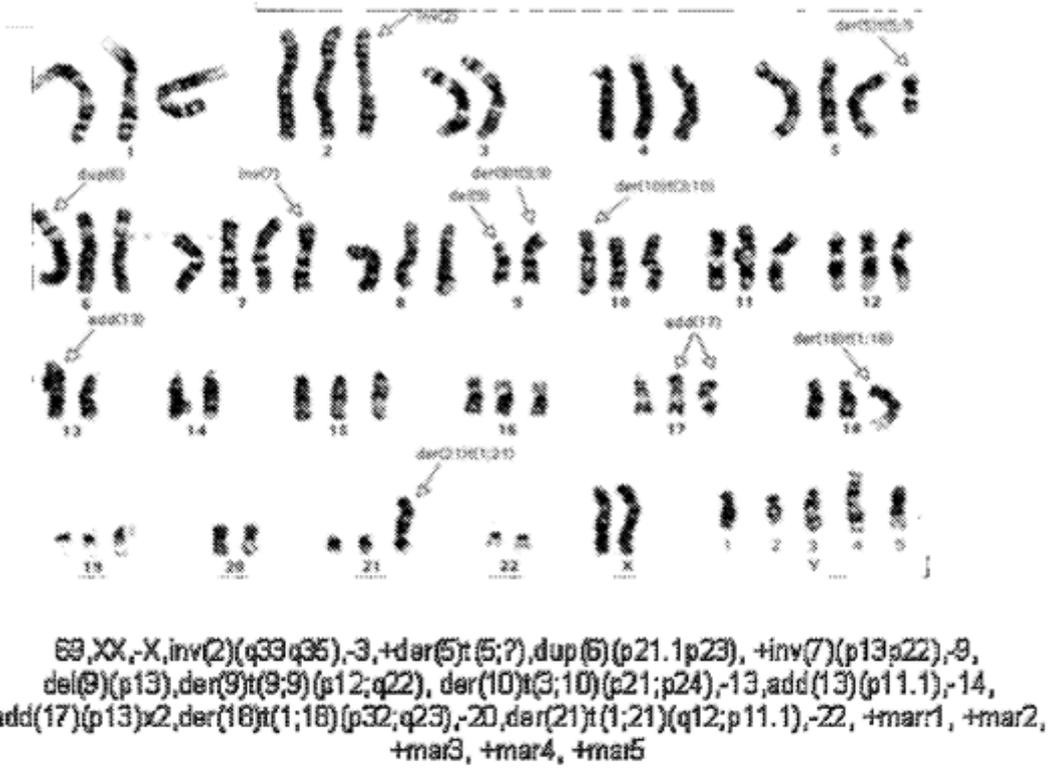


Figura 24.

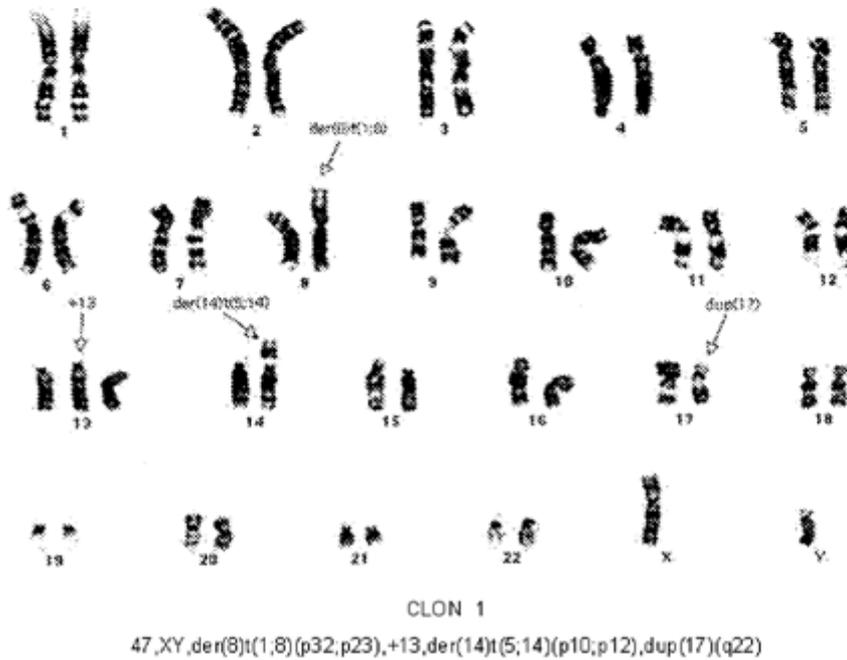
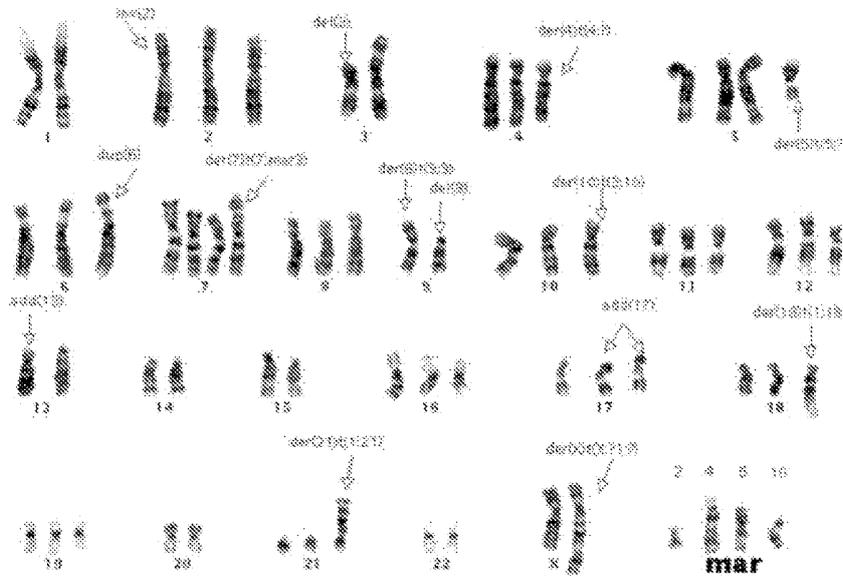


Figura 25.

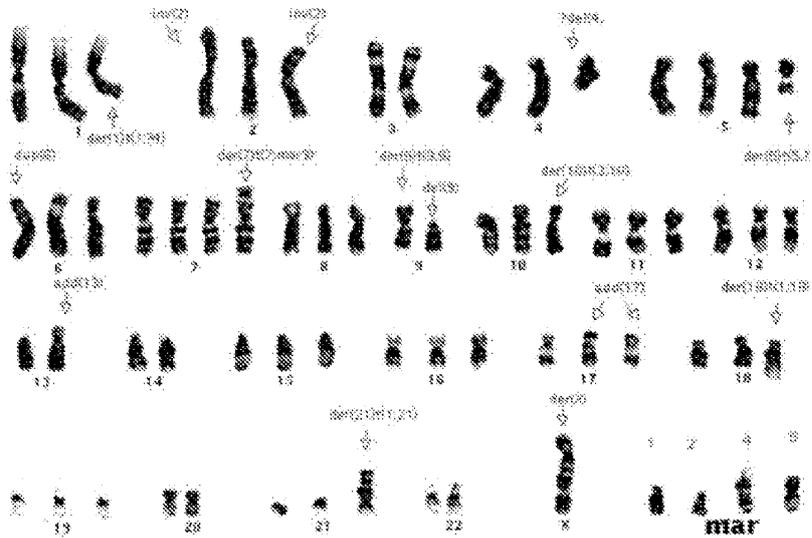


KBT (CD19+) Y (CD4+)

65-66,X,der(X)t(X;?1;?)(q13;?;?), -X, -1, inv(2)(q33q35),-3,del(3)(p14),
 der(4)t(4;?)(q25;?),+der(5)t(5;?)(q11.2;?),dup(6)(p21.1p23),+der(7)t(7;mar3)(q10;q10),-9,
 del(9)(p13),der(9)t(9;9)(p12;q22), der(10)t(3;10)(p21;p24),-13,add(13)(p11.1),-14, -15,
 add(17)(p13)x2,der(18)t(1;18)(p32;q23),-20,der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22,+mar2, +mar4,
 +mar5, +mar10

Figura 26.

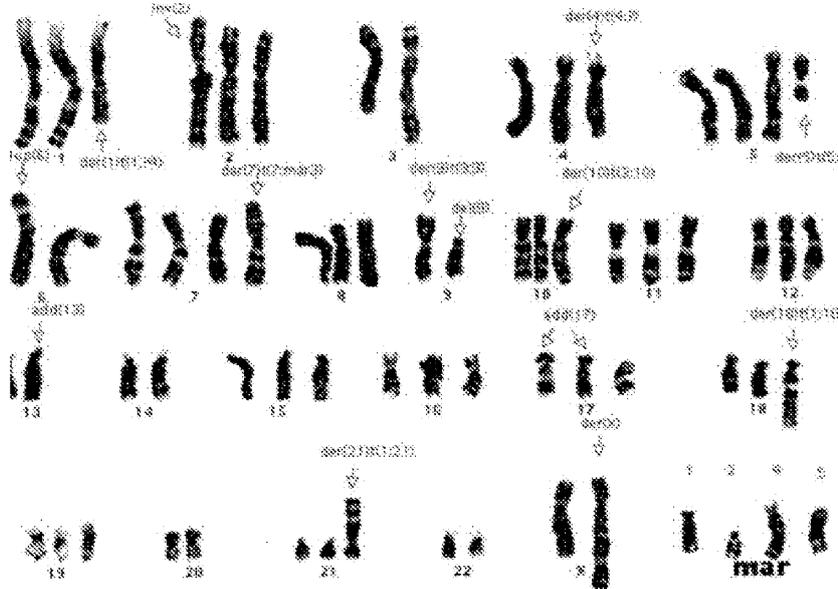
(A)



CLON 1 DE KBT (CD20+CD72+) Y (CD4+CD8+)

66-68,X,der(X)t(X;?1;?)(q13;?;?), -X, der(1)t(1;21)(q13;?;?), inv(2)(q33q35),-3,
 ?del(4)(?q25q35),+der(5)t(5;?)(q11.2;?),dup(6)(p21.1p23),+der(7)t(7;mar3)(q10;q10),-9,
 del(9)(p13),der(9)t(9;9)(p12;q22), der(10)t(3;10)(p21;p24),-13,add(13)(p11.1),-14,
 add(17)(p13)x2,der(18)t(1;18)(p32;q23),-20,der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1+mar2,
 +mar4, +mar5

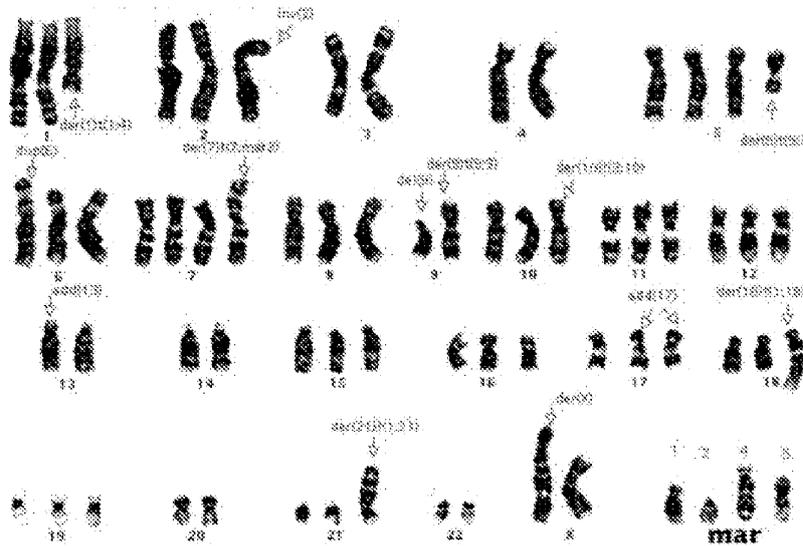
(B)



CLON 2 DE KBT (CD20+CD72+) Y (CD4+CD8+)

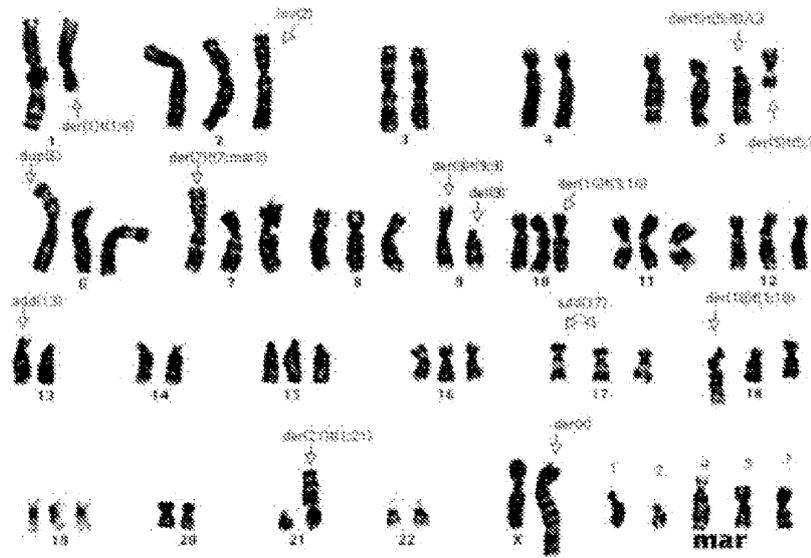
65-67,X,der(X)t(X;?1;?)(q13;?;?),-X, der(1)t(1;?4)(q21.3;?q25), inv(2)(q33q35),-3, der(4)t(4;?)(q25;?)+der(5)t(5;?)(q11.2;?)+dup(6)(p21.1p23),+der(7)t(7;mar3)(q10;q10),-9, del(9)(p13),der(9)t(9;9)(p12;q22), der(10)t(3;10)(p21;p24),-13,add(13)(p11.1),-14, add(17)(p13)x2,der(18)t(1;18)(p32;q23),-20,der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1+mar2, +mar4, +mar5

(C)



CLON 3 DE KBT (CD20+CD72+) Y (CD4+CD8+)

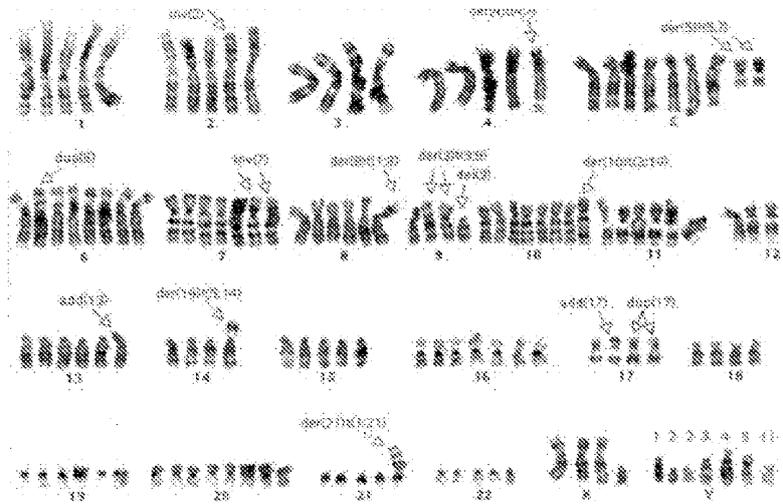
67-68,X,der(X)t(X;?1;?)(q13;?;?),-X, der(1)t(1;4)(p10;p10), inv(2)(q33q35),-3,+der(5)t(5;?)(q11.2;?)+dup(6)(p21.1p23),+der(7)t(7;mar3)(q10;q10),-9, del(9)(p13),der(9)t(9;9)(p12;q22), der(10)t(3;10)(p21;p24),-13,add(13)(p11.1),-14, add(17)(p13)x2,der(18)t(1;18)(p32;q23),-20,der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1+mar2, +mar4, +mar5



CLON 4 DE KBT (CD20+CD72+) Y (CD4+CD8+)

66,X,der(X)t(X;?) (q13;?) , -X, der(1)t(1,4)(p10;p10), inv(2)(q33q35), -3, -4, +der(5)t(5;?) (q11.2;?), der(5)t(5;?) d/G)(p10;p10), dup(6)(p21.1p23), +der(7)t(7;mar3)(q10;q10), -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22), der(10)t(3;10)(p21;p24), -13, add(13)(p11.1), -14, add(17)(p13)x2, der(18)t(1;18)(p32;q23), -20, der(21)t(1;21)(q12;p11.1), -22, +mar1+mar2, +mar4, +mar5

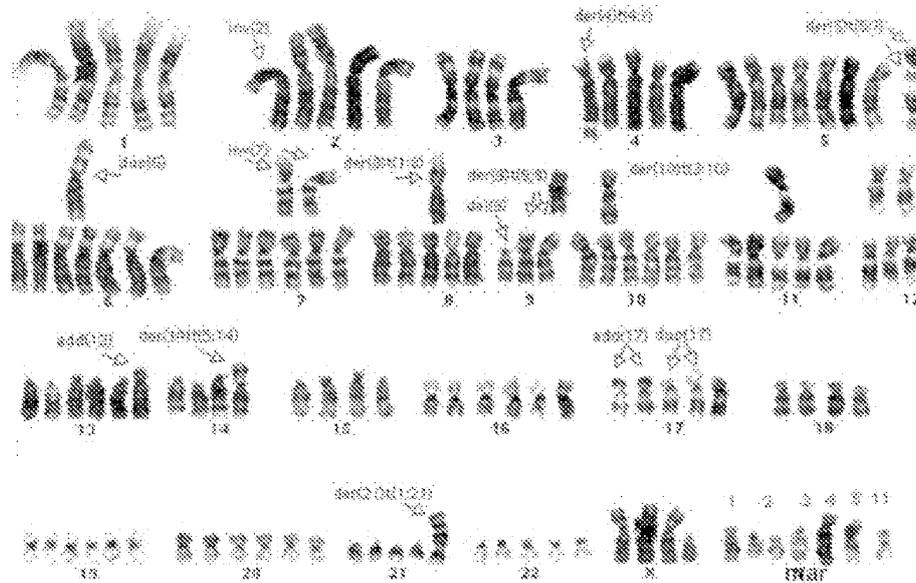
Figura 27.



KWT (CD4+)

129-140,XXXY, -X, -X, -1, -2, inv(2)(q33q35), -3, -3, der(4)t(4;?) (q35;?), +5, +der(5)t(5;?) (q11.2;?) x2, +6, +dup(6)(p21.1p23), +7, +inv(7)(p13p22) x2, der(8)t(1;8)(p32;p23), -9, -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22) x2, +der(10)t(3;10)(p21;p24), -12, add(13)(p11.1), -14, -14, der(14)t(5;14)(p11;p12), -15, -17, add(17)(p13) x2, dup(17)(q22q23) x2, -18, -18, +20, der(21)t(1;21)(q12;p11.1), -22, +mar1, +mar2 x2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar11

Figura 28.

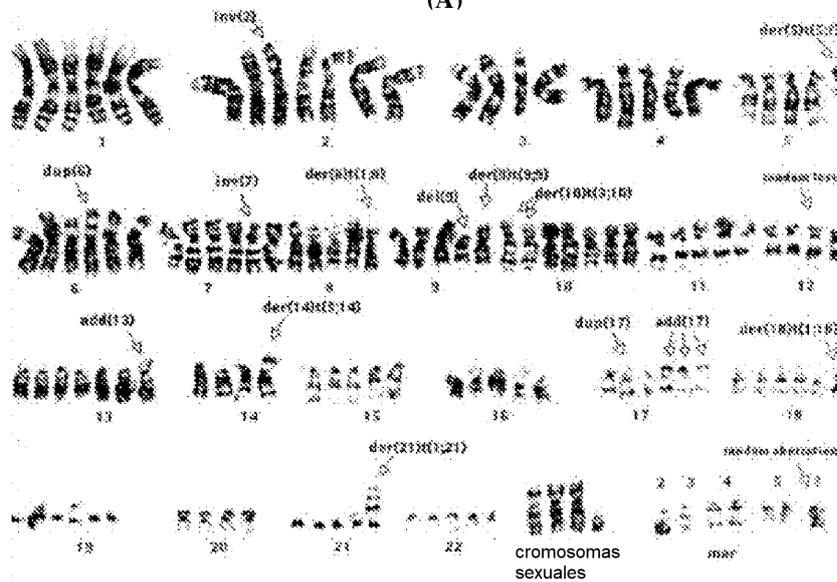


KWT (CD3+CD5+)

135-142,XXXY, -X, -X, -1, -2, inv(2)(q33q35),-3,-3,-4, der(4)t(4;?) (q35;?),+5, +der(5)t(5;?) (q11.2;?)x2, +6, +dup(6)(p21.1;p23), +inv(7)(p13;p22)x2, der(8)t(1;8)(p32;p23), -9,-9, del(9)(p13),der(9)t(9;9)(p12;q22)x2, +der(10)t(3;10)(p21;p24), -12, add(13)(p11.1), -14, -14, der(14)t(5;14)(p11;p12); -15,-17, add(17)(p13)x2, dup(17)(q22q23)x2,-18, -18, +20,der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1,+mar2x2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar9, +mar11

Figura 29.

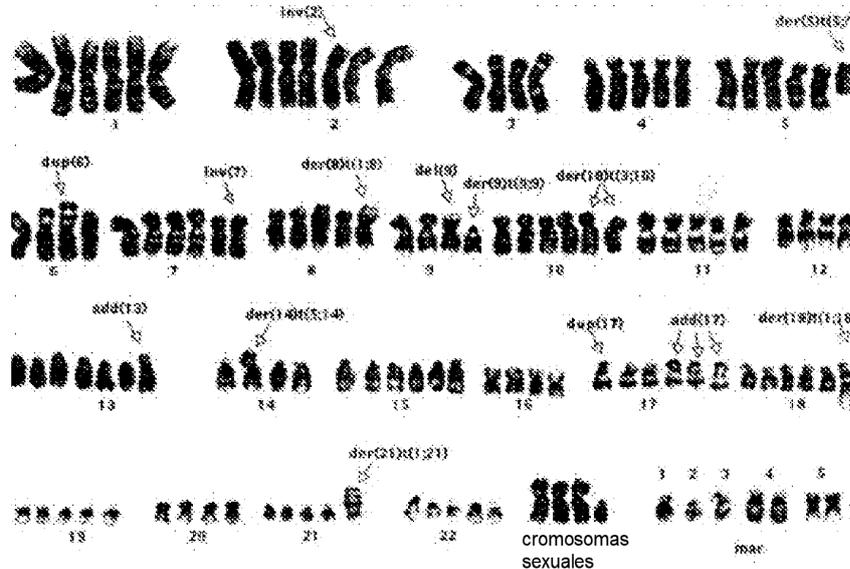
(A)



CLON 1 DE KWT (CD4+CD8+)

124-139,XXXY, +1, +2,+2, inv(2)(q33q35),-3,+der(5)t(5;?) (q11.2;?), +6, dup(6)(p21.1;p23), +inv(7)(p13;p22), der(8)t(1;8)(p32;p23), del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22),+10,+10 +der(10)t(3;10)(p21;p24)x2,+13,+13, add(13)(p11.1),-14, der(14)t(5;14)(p11;p12); add(17)(p13)x2, +add(17)(p13), dup(17)(q22q23),+18,der(18)t(1;18)(p32;q23),+19, -20, der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1,+mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5x2

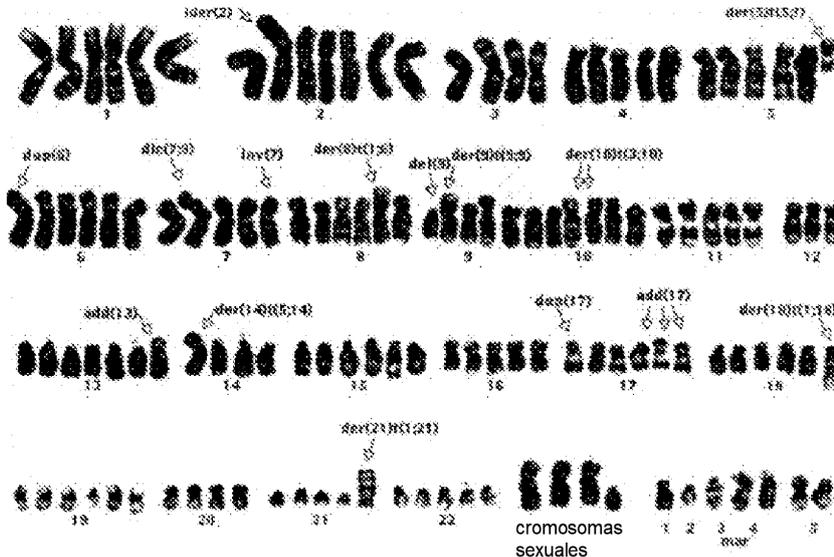
(B)



CLON 2 DE KWT (CD4+CD8+)

125-131,XXXY, +1, +2,+2, inv(2)(q33q35),-3,+der(5)t(5;?)(q11.2;?), +6, dup(6)(p21.1p23), +inv(7)(p13p22), der(8)t(1;8)(p32;p23), -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22),+10,+10 +der(10)t(3;10)(p21;p24)X2,+13,+13, add(13)(p11.1),-14, der(14)t(5;14)(p11;p12); add(17)(p13)x2, +add(17)(p13), dup(17)(q22q23),+18,der(18)t(1;18)(p32;q23),+19,-20, der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4x2,+mar5x2

(C)

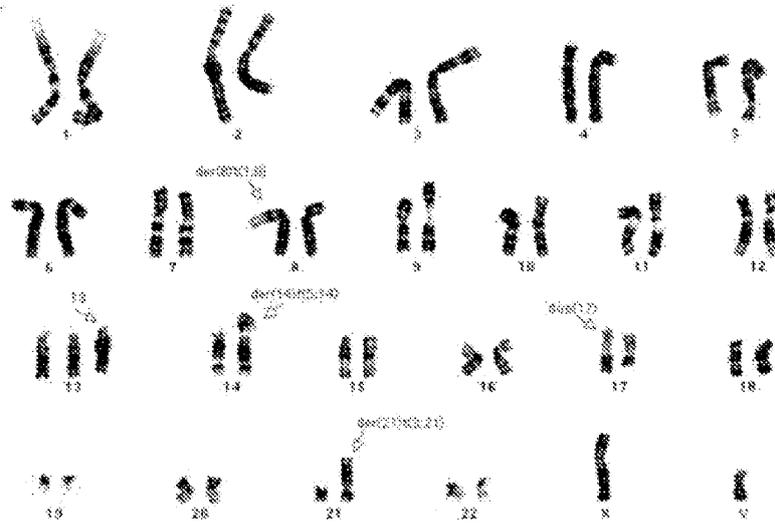


CLON 3 DE KWT (CD4+CD8+)

125-131,XXXY, +1, +2,+2, inder(2)(q10)inv(2)(q33q35),-3,+der(5)t(5;?)(q11.2;?), +6, dup(6)(p21.1p23), dic(7;9)(p22;q11), +inv(7)(p13p22), der(8)t(1;8)(p32;p23), -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22),+10,+10 +der(10)t(3;10)(p21;p24)X2,+13,+13, add(13)(p11.1),-14, der(14)t(5;14)(p11;p12); add(17)(p13)x2, +add(17)(p13), dup(17)(q22q23),+18,der(18)t(1;18)(p32;q23),+19,-20, der(21)t(1;21)(q12;p11.1),-22, +mar1,+mar2,+mar3,+mar4x2,+mar5x2

Figura 30.

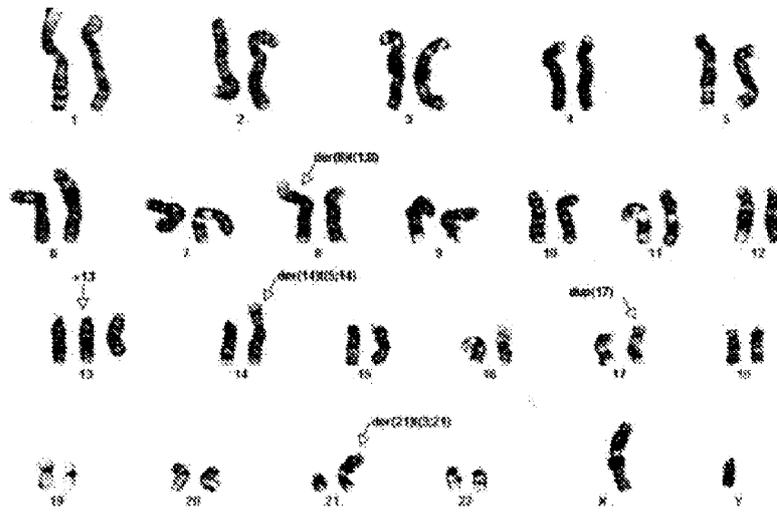
(A)



WWM (CD14+)

47,XY, der(8)t(1;8)(p32;p23),+13,der(14)t(5;14)(p11;p12),dup(17)(q22q23),
der(21)t(3;21)(q23;p11.1)

(B)



WWM (CD14+) enriquecido

47,XY, der(8)t(1;8)(p32;p23),+13,der(14)t(5;14)(p11;p12),dup(17)(q22q23),
der(21)t(3;21)(q23;p11.1)

Figura 31.

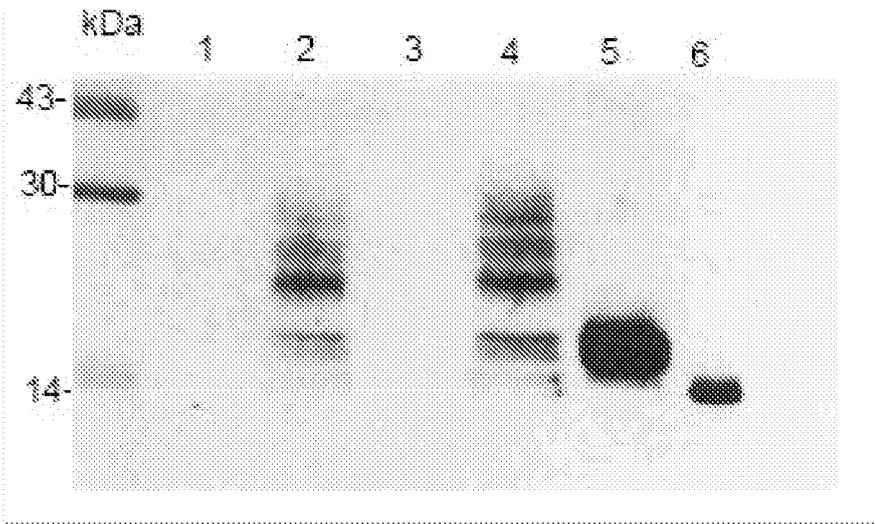


Figura 32.

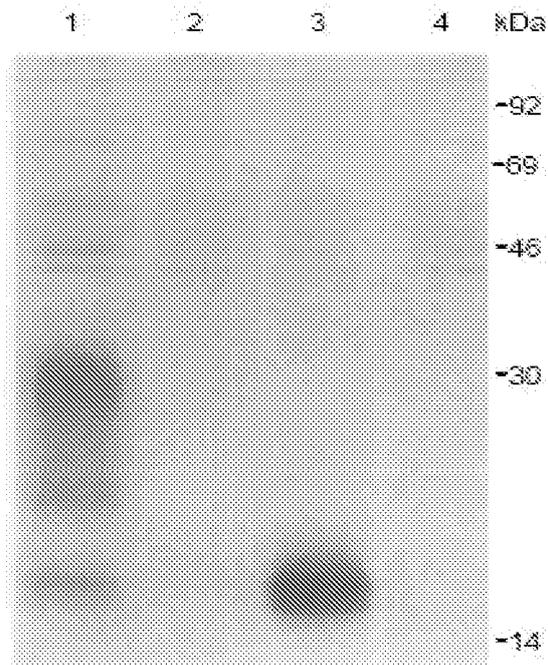


Figura 33.

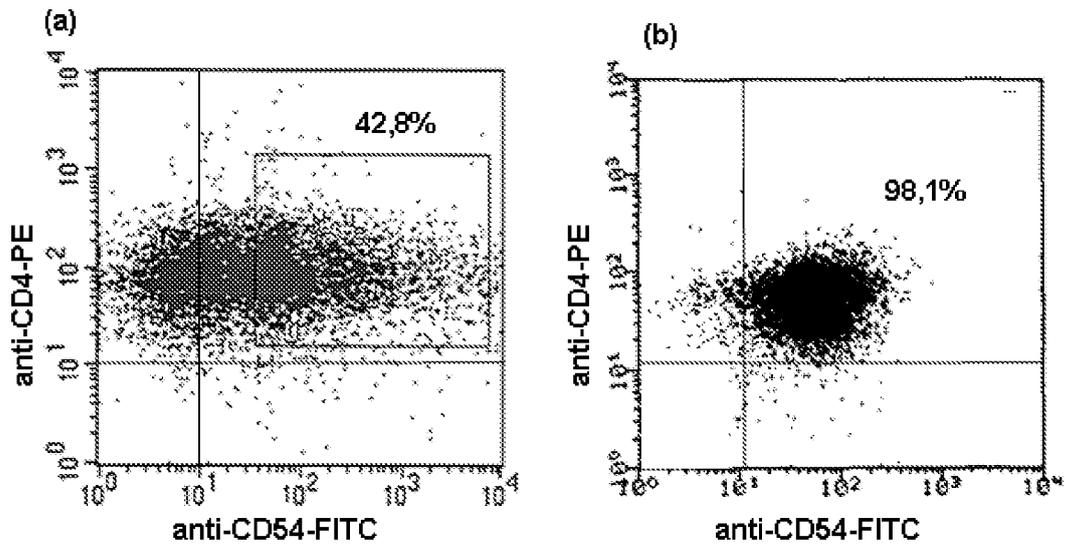


Figura 34.

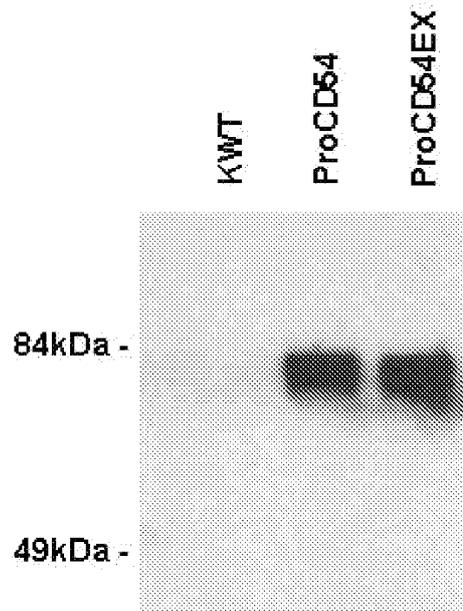


Figura 35.

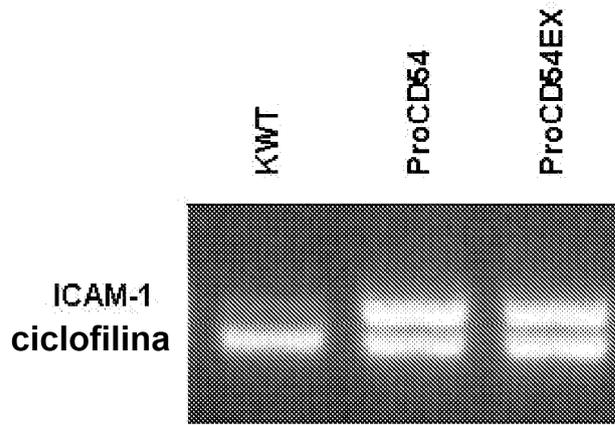


Figure 36.

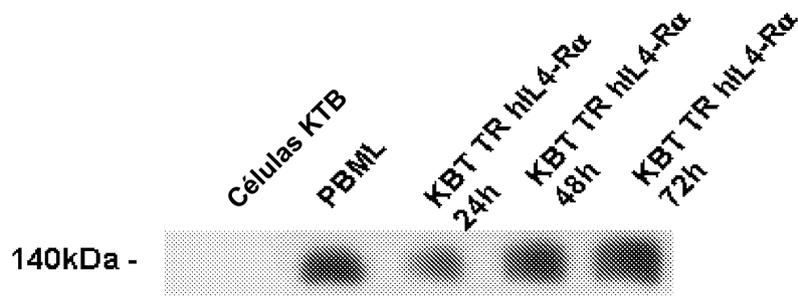


Figura 37.

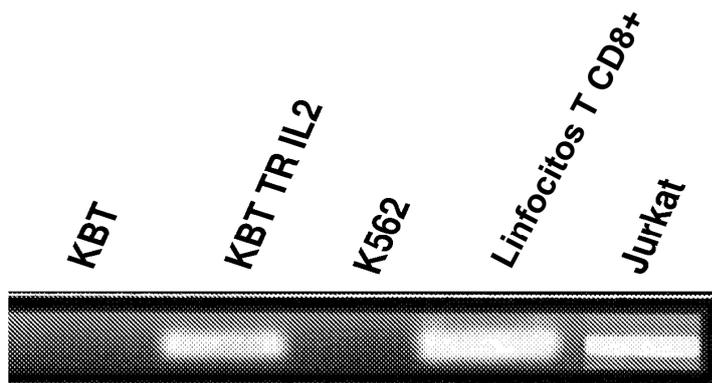


Figura 38.

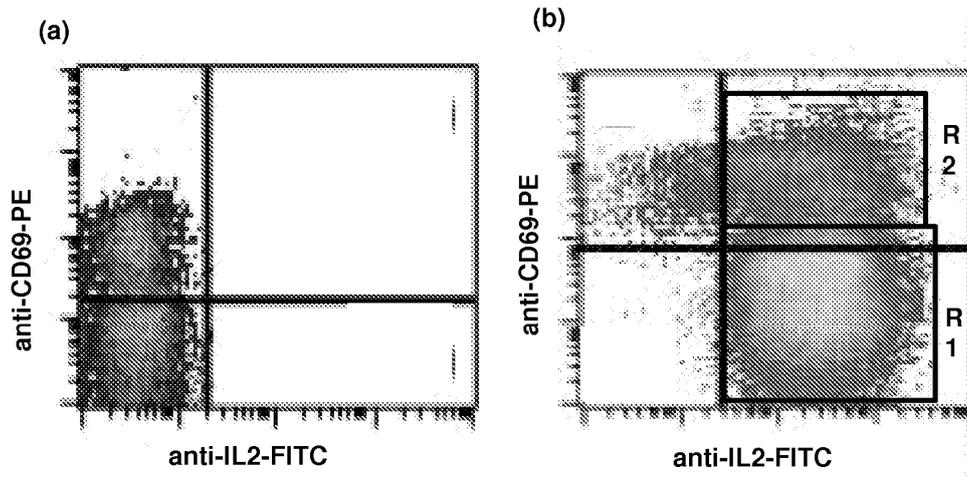


Figura 39.

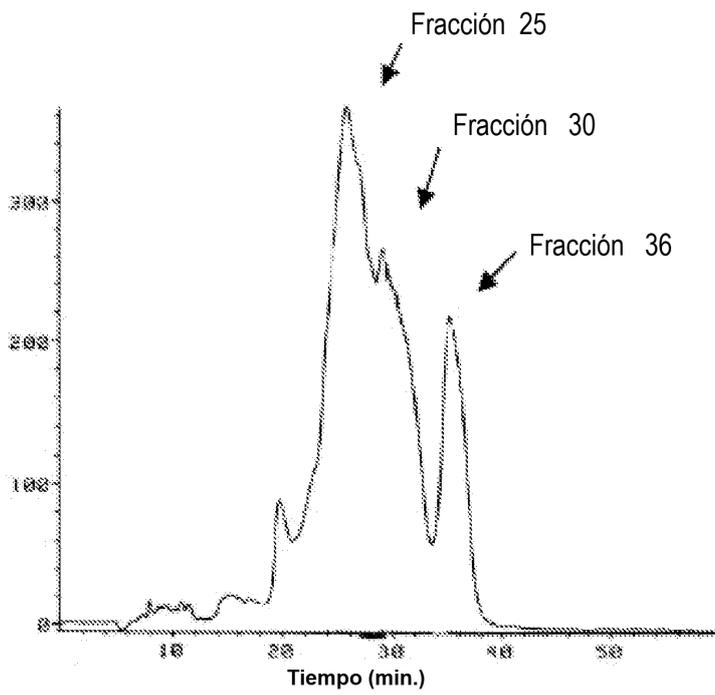


Figura 40.

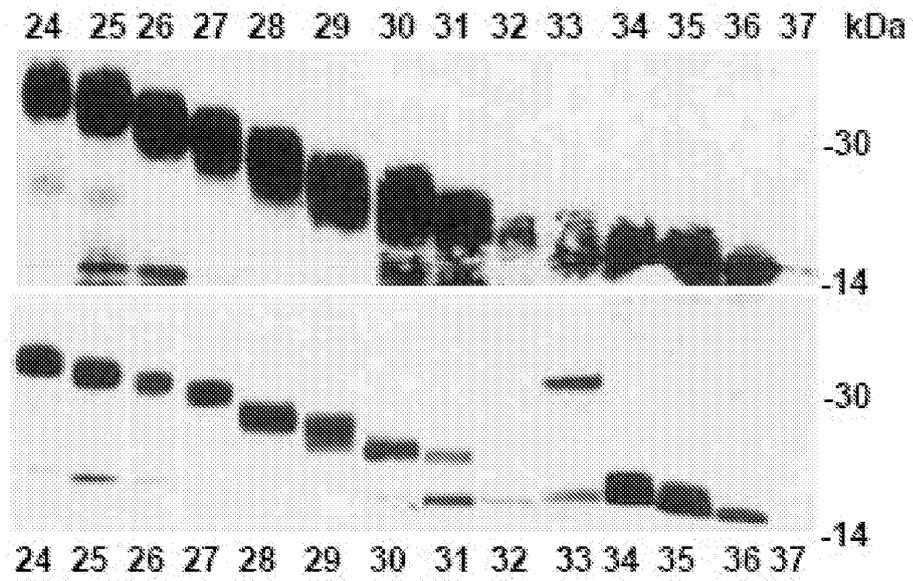


Figura 41.

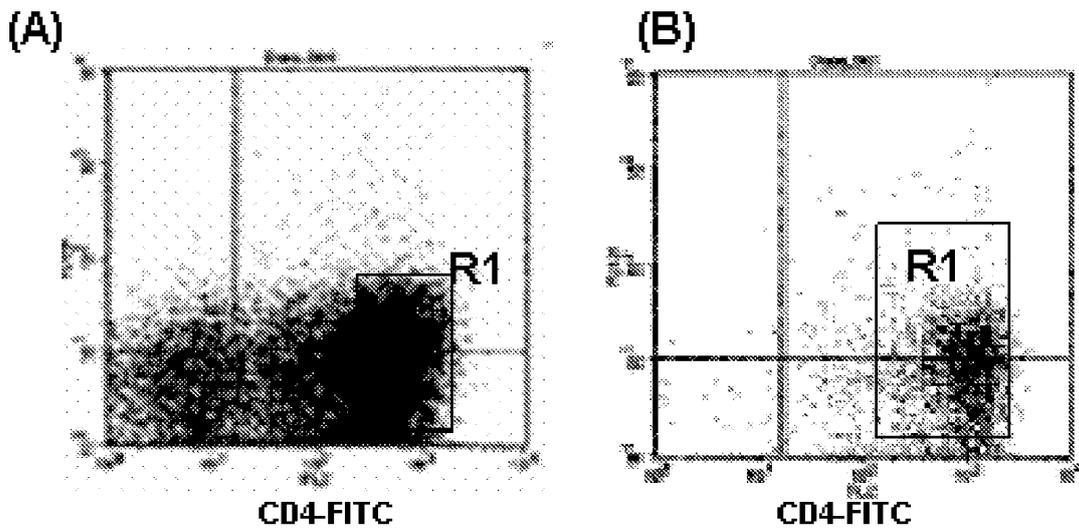


Figura 42.

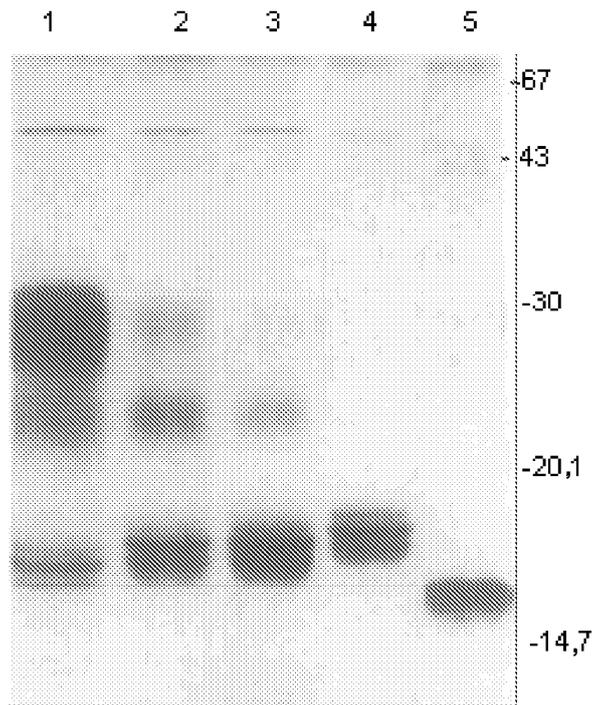


Figura 43.

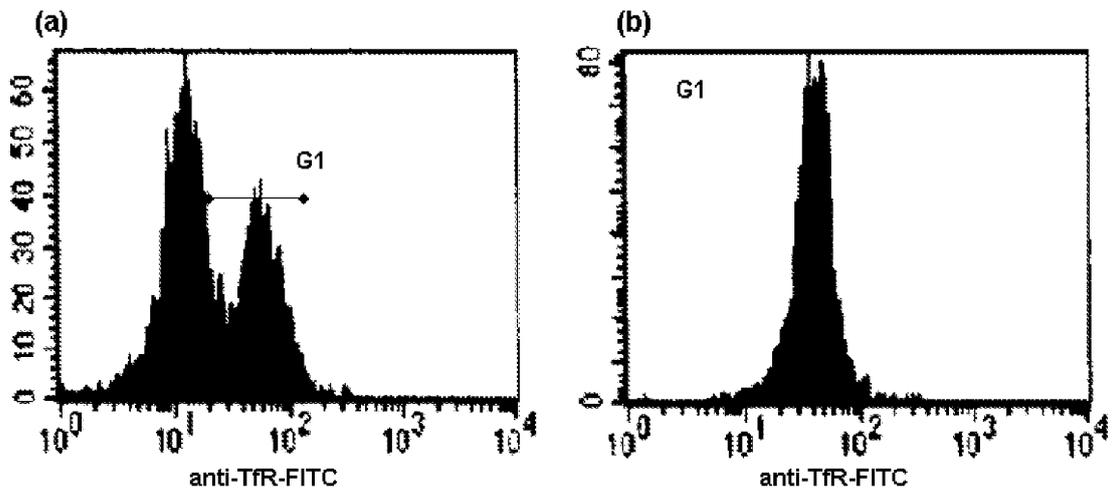


Figura 44.

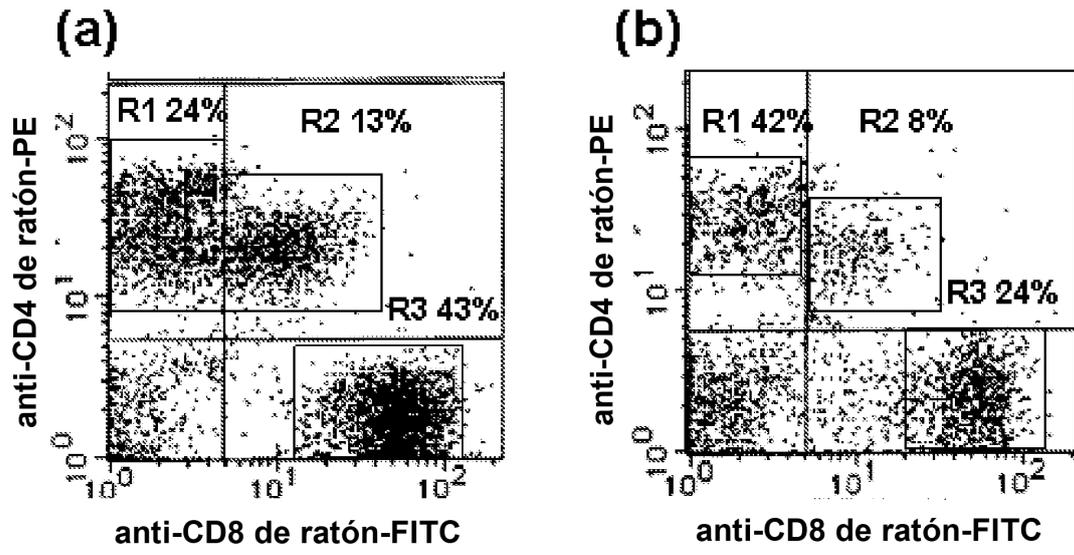


Figura 45.

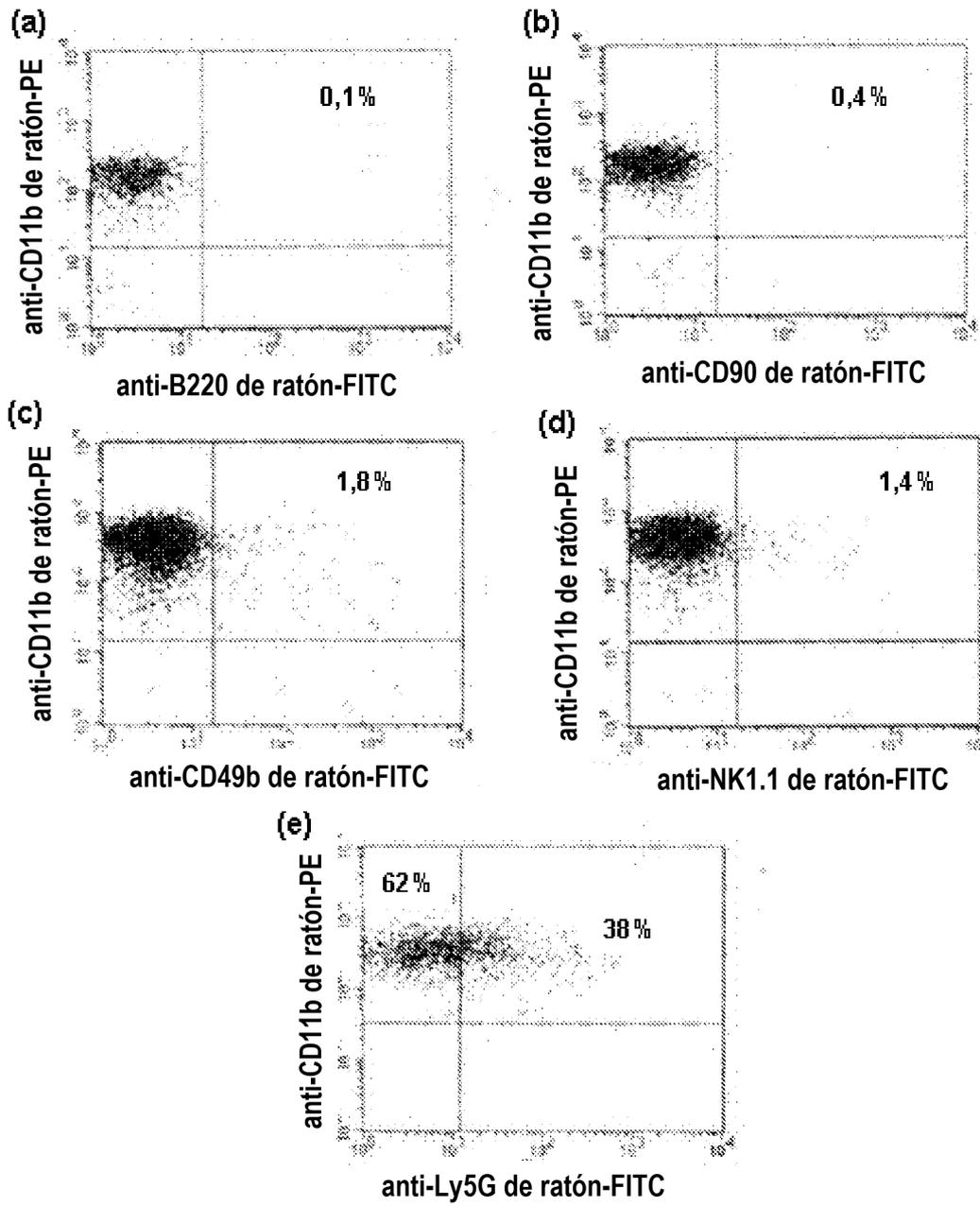


Figura 46.

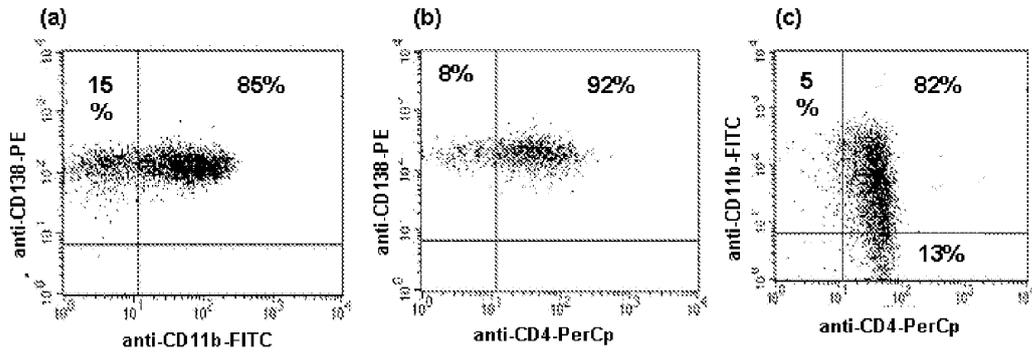


Figura 47.

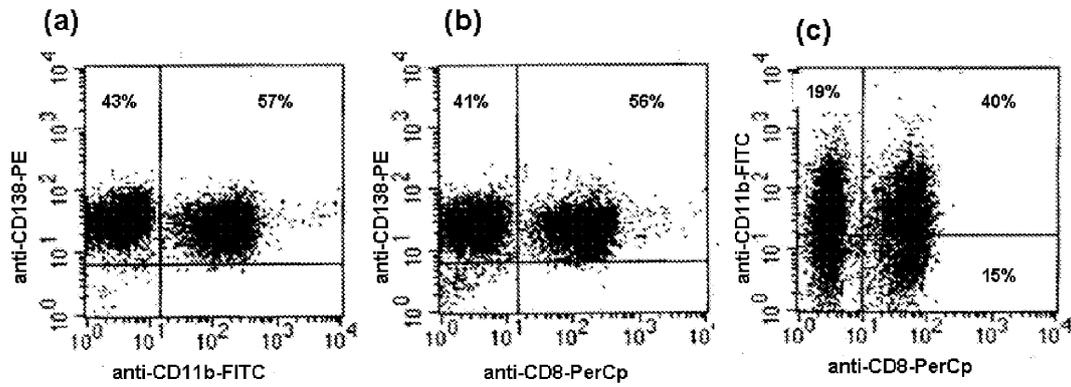


Figura 48.

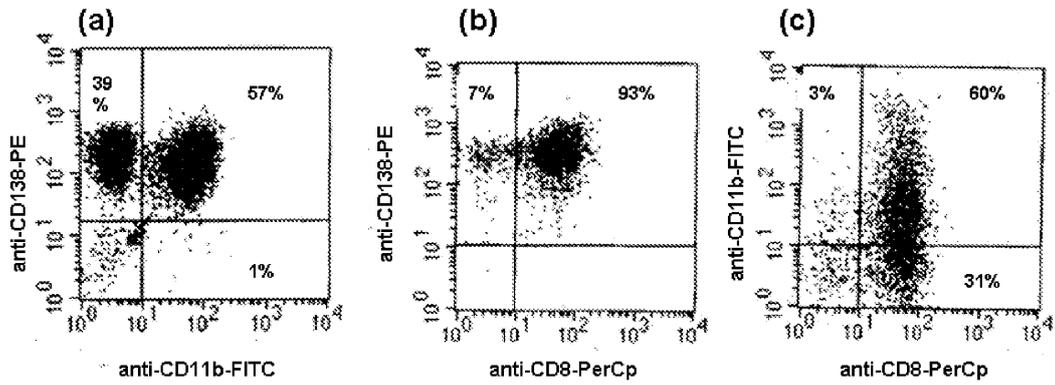


Figura 49.

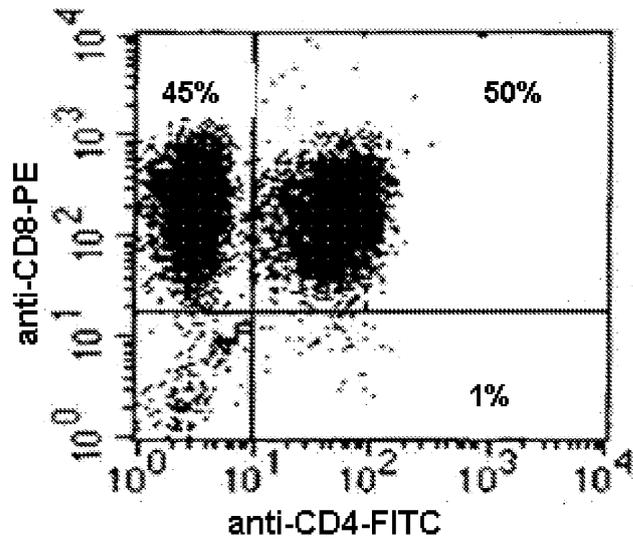


Figura 50.

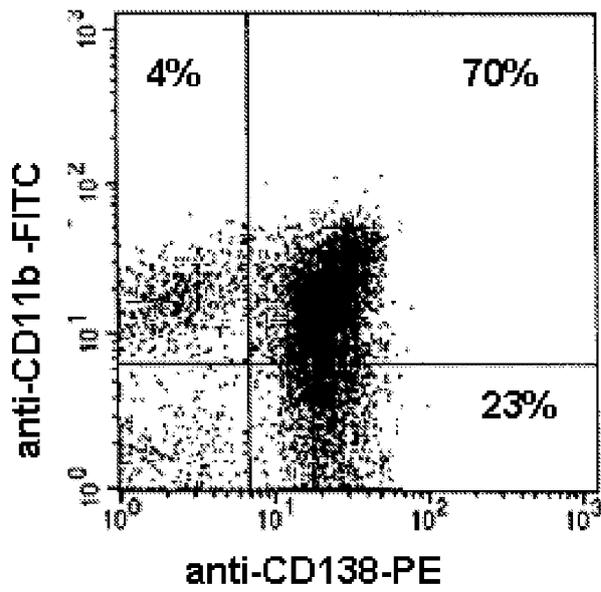


Figura 51.

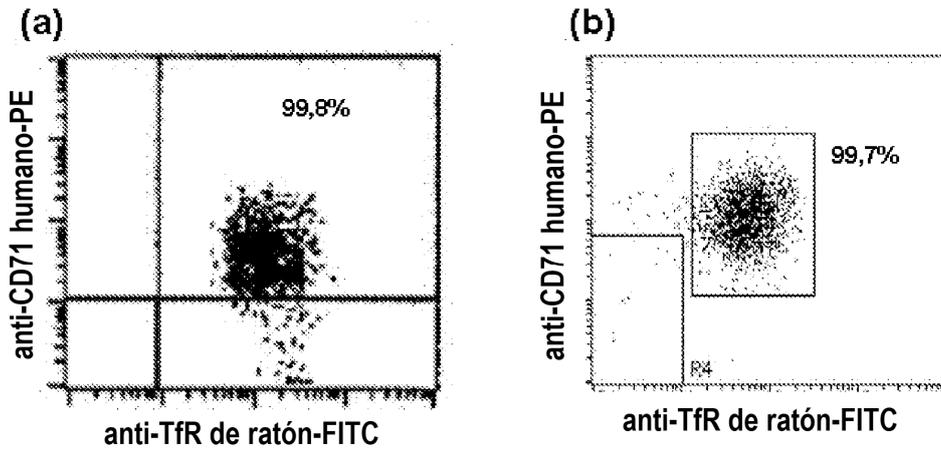


Figura 52.

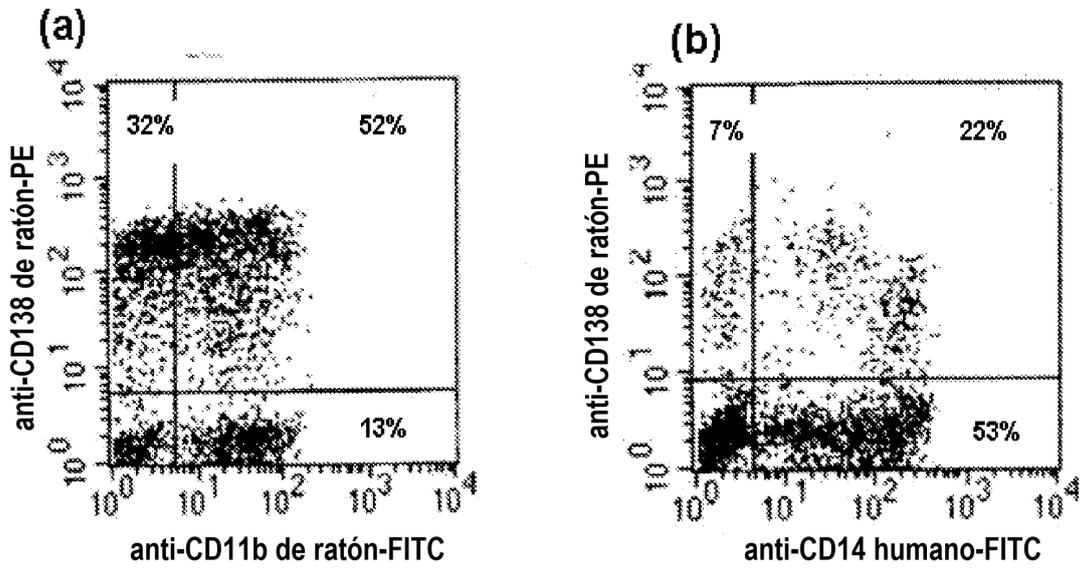


Figura 53.

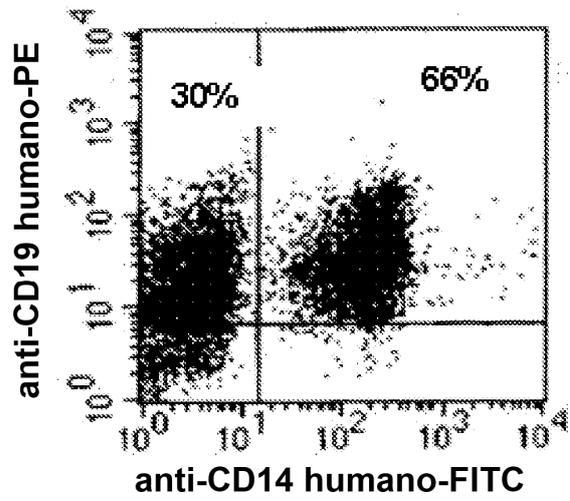


Figura 54.

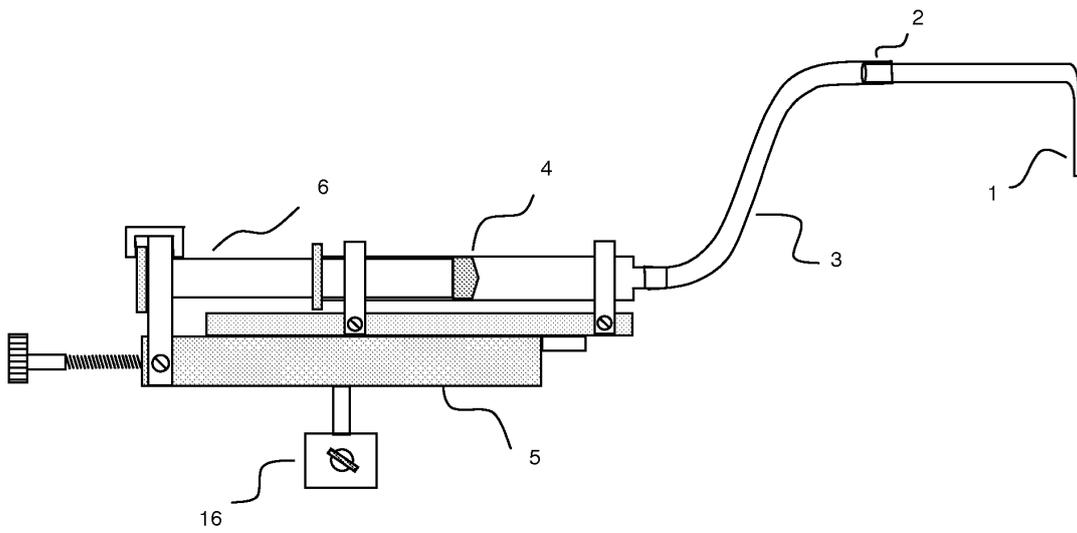


Figura 55.

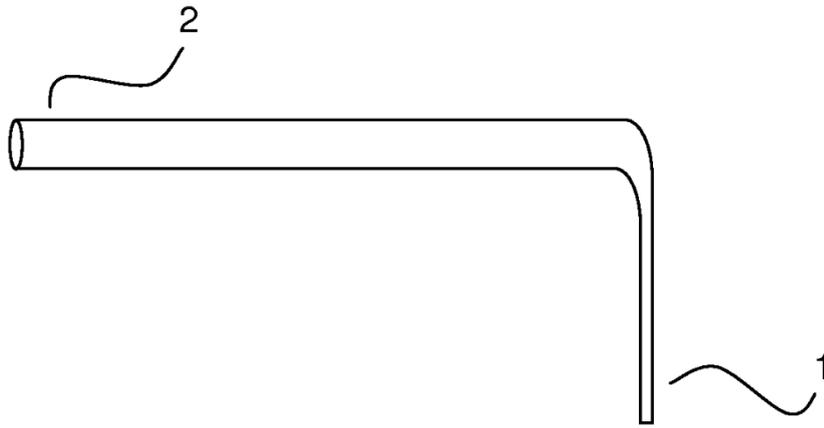


Figura 56.



Figura 57

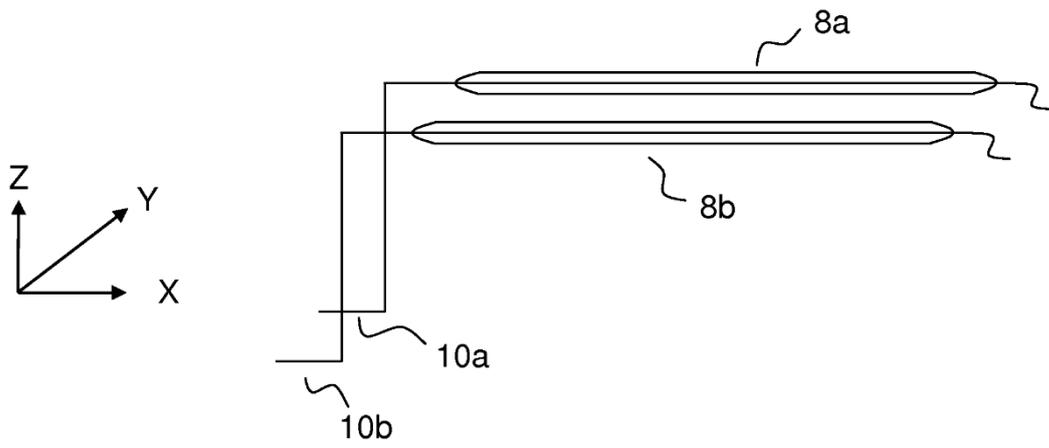


Figura 58.

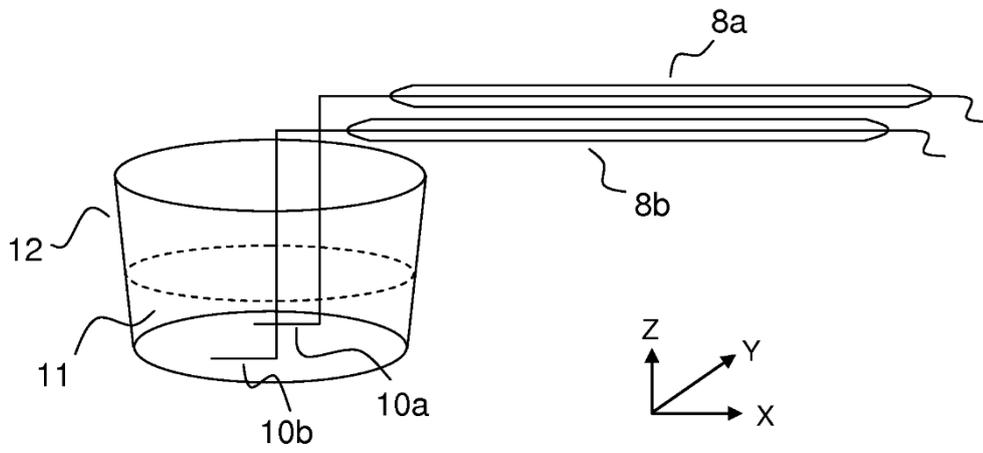


Figura 59.

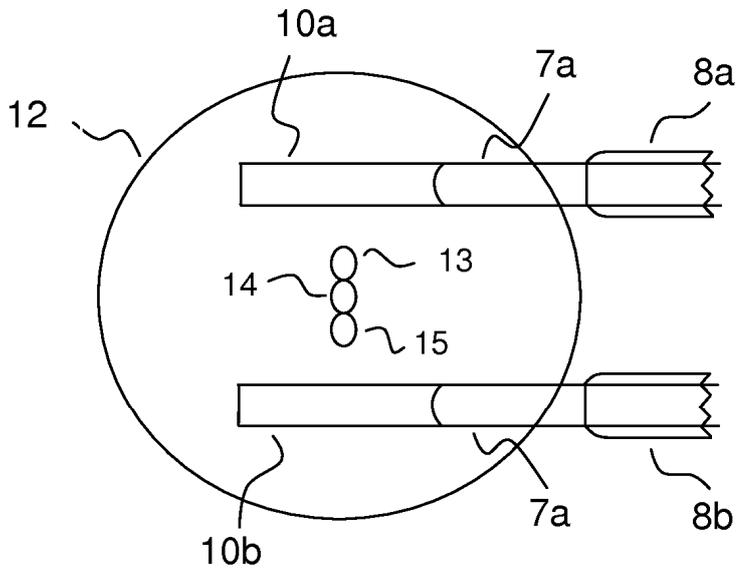


Figura 60.

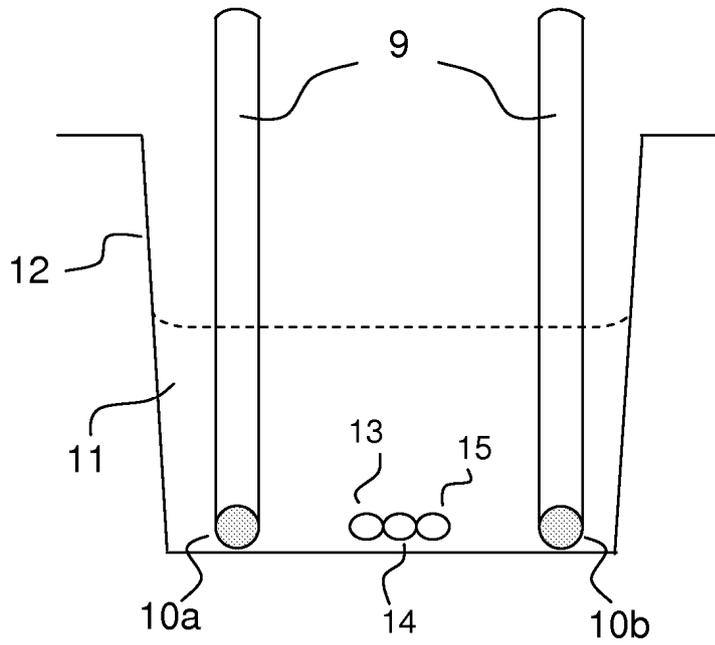


Figura 61.

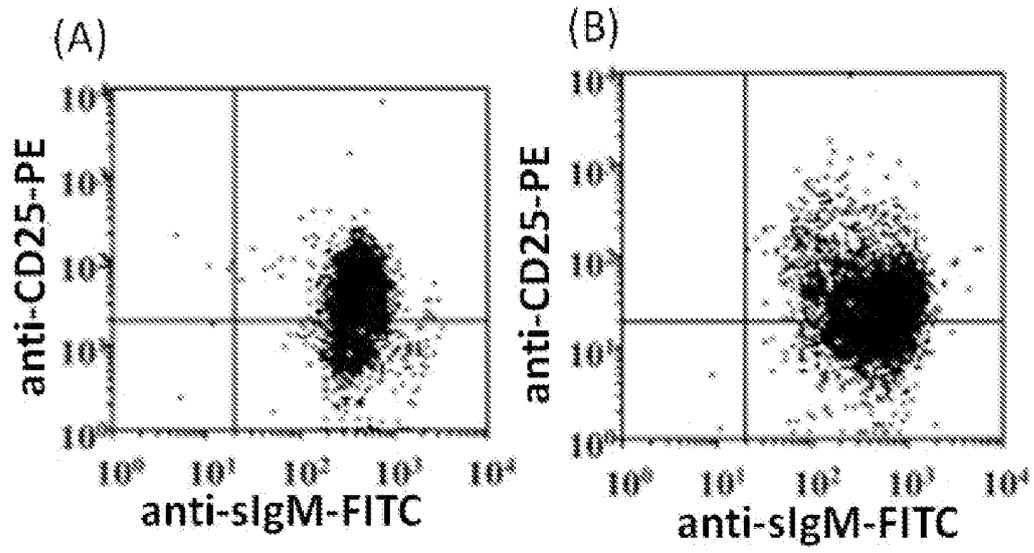


Figura 62.