



ARTÍCULO
ORIGINAL

Inducción de Fenotipo Presentador de Antígenos y Apoptosis en Células de Leucemia Linfática Crónica B Incubadas con Oligodeoxinucleótidos Sintéticos con motivos PyNTTTTGT (IMT504).

Dupont J, Fló J, Zorzó pulos J, Solimano J, López R, Garay G, Riveros D, Montaner A, Rodríguez J, Fernández J, Elías F, Cacchione R.

CEMIC, IMMUNOTECH

I Premio del XVI Congreso Argentino de Hematología

Correspondencia: Juan Carlos Dupont - CEMIC - Galván 4102. Buenos Aires (1431)
Tel: 4546 8230 - E-mail: jcdupont@yahoo.com

Fecha de recepción: 03-09-03
Fecha de aceptación: 18-10-03

HEMATOLOGÍA, Vol. 7 N° 3: 167-175
Noviembre-Diciembre, 2003

RESUMEN

Introducción: El sistema inmune no es capaz de reconocer los cambios en células transformadas por mutaciones en la leucemia linfática crónica de estirpe B (LLC-B). Su incubación con linfocitos autólogos no induce citotoxicidad. Puede deberse a la ausencia de linfocitos T citotóxicos o a la incapacidad de las células de LLC en expresar moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), a pesar de tener expresión de HLA clase I y II. El ADN bacteriano y los ODNs que contienen motivos PyNTTTTGT, CpG y otros motivos, pueden activar a los monocitos, las células dendríticas y los linfocitos B. Aparte, algunos ODNs tienen efectos directos sobre las células LLC-B.

Material y métodos: se incubaron células leucémicas provenientes de 20 pts. con LLC-B con 3 diferentes ODNs: a) IMT504, con motivos PyNTTTTGT b) 2006 con motivos CpG y c) ODN inactivo de control. Previo y posterior a la incubación se efectuaron determinaciones de CD80, CD86, CD40, MHC clase I y II, CD5, CD19 y CD20 por citometría de flujo. Además se determinó (por medio de la detección de fosfatidil-serina por la unión a la Anexina V) la capacidad de inducir la apoptosis de las células transformadas, y se estudió la morfología de las células en cultivo.

Resultados: Se observó el aumento de la expresión de CD80, CD86 y CD40 en las células incubadas con IMT504 y 2006. Además las células LLC-B expresaron significativamente mayor cantidad de Anexina V. La morfología de las células en cultivo a largo plazo mostró las características de apoptosis. Los estudios efectuados con el ODN de control no mostraron ninguna de las características descritas.

Conclusión: La incubación de ODN con motivos PyNTTTTGT (IMT504) y con motivos CpG (2006) induce en las células de LLC-B un fenotipo considerado de células presentadoras de antígenos, y además apoptosis.

Perspectiva: En otros estudios preclínicos y clínicos los ODNs han demostrado muy baja toxicidad, lo que permitiría efectuar estudios de Fase I/II en LLC-B.

Palabras clave: Leucemia linfática crónica, oligonucleótidos, inmunobiología

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las neoplasias humanas eluden el sistema inmune a pesar de que muchas de ellas expresan antígenos o epitopes propios que no se expresan en las células germinales y por lo tanto no incluidos en el repertorio original¹.

La leucemia linfática crónica es la enfermedad leucémica más frecuente del mundo occidental². Es un trastorno linfoproliferativo maligno, originado en células de estirpe B (LLC-B) en más del 95% de los casos³. Biológicamente se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B (CD5), que aunque no tengan un índice de mitosis elevado, tienen por el contrario, una larga supervivencia⁴. Característicamente tienen sobrerregulada la expresión de proteínas antiapoptóticas, como la bcl-2^{5,6,7}.

Las características clínicas de la enfermedad han sido revisadas extensamente en la literatura⁸. La presencia de más de 5000 linfocitos B, CD5 positivos y monoclonales, es decir con expresión de inmunoglobulinas de superficie monotípicas kappa o lambda, son los elementos de diagnóstico mínimos requeridos actualmente. Además, los pacientes suelen presentar adenopatías, en general pequeñas o en muy lento incremento, simétricas, esplenomegalia, anemia hipoproliferativa y/o trombocitopenia. Los elementos citados han permitido clasificar a la LLC-B en estadios progresivos, cada uno de los cuales está direc-

tamente relacionado con un pronóstico de supervivencia más breve. Son frecuentes (hasta el 20%) la presencia de alteraciones autoinmunes, típicamente la anemia hemolítica por anticuerpos calientes, y la trombocitopenia inmune. Menos frecuentemente, la causa de la anemia es la eritroplasia inmune. Casi universalmente, estos pacientes se presentan con hipogammaglobulinemia.

Además de la caracterización clínica, se han individualizado dos grandes grupos de LLC-B, de acuerdo al estado mutacional del gen la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Ig V_H), que se produce en el centro germinal de los folículos linfáticos. Los pacientes que tienen el gen Ig V_H mutado tienen un pronóstico definitivamente mejor que los no mutados^{9,10}. La capacidad predictora de esta mutación somática ha demostrado ser independiente de otras variaciones fenotípicas como la expresión de CD38¹¹, y estar inversamente asociada a la expresión de una tirosin kinasa (*zeta-chain-associated kinase*) ZAP70^{12,13}.

Una de las características de las células B normales es la de transformarse en células presentadoras de antígenos y de esta manera inducir una respuesta T citotóxica específica a determinado antígeno. En el caso de la LLC-B, el epitope de la inmunoglobulina monotípica del clon leucémico o alguno de los cambios somáticos inducidos por las alteraciones genéticas recurrentes asociadas a LLC-B, podrían considerarse "neoantígenos" o "antígenos tumorales" y a su turno inducir respuesta T citotóxica específica¹. Una de las características biológicas de las células de la LLC-B es la de ser defectuosas presentadoras de antígenos, por expresar débilmente las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86¹⁴. Experiencias biológicas y clínicas conducidas por Kipps y col., por intermedio de la transfección, con un vector adenoviral, de células LLC-B para que expresen el ligando del CD40 (CD154), lograron incrementar la expresión de dichas moléculas coestimuladoras y secundariamente una expansión de los linfocitos T con actividad citotóxica con especificidad antileucémica¹⁵. La actividad pudo ser detectada tanto *in vitro*, con aumento de la autoreactividad medida con el ensayo de Elispot, como *in vivo*, con una disminución considerable de la carga tumoral leucémica en un número de los pacientes cuyas células leucémicas fueron transfectadas *ex vivo* y posteriormente reinfundidas.

El sistema inmune innato de los vertebrados, al igual que el de los insectos, se caracteriza por reaccionar en forma rápida e inespecífica ante la invasión de la mayoría de los patógenos^{16,17,18}. Para que esta respuesta sea efectiva, el sistema inmune reconoce ciertas estructuras conservadas en los distintos patógenos, como péptidos formilados (hongos),

lipopolisacáridos (bacilos Gram-), lipopéptidos (Gram+), lipopéptidomannanos (micobacterias), lipoproteínas (espiroquetas), péptidoglicanos, ácido teicoico (cocos Gram+) y el ADN no metilado (bacterias)¹⁹. Todos ellos en conjunto se denominan PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Los PAMPs son reconocidos por una familia de 10 receptores hasta ahora descritos, denominados genéricamente "toll like receptors" (TLR) que reaccionan ante estas señales de peligro. Para cada PAMP se ha identificado un TLR específico²⁰. Cuando estas estructuras entran en contacto con células del sistema monocítico macrófago, células dendríticas, linfocitos B y células endoteliales, entre otras, se produce la activación del NF-KB (*nuclear factor kappa B*) a través de las IRAKs (*interleukin 1 receptor associated kinases*) y TRAFs (*TNF receptor associated factor*), con la consecuente activación de los genes de IL-1, IL-6 e IL-8, considerados potentes activadores de la respuesta inmune²¹.

Del mismo modo que el ADN bacteriano, los oligonucleótidos (ODNs) sintéticos con determinadas secuencias o "motivos" también pueden comportarse como activadores del sistema inmune. Se describieron ODNs con actividad inmunoestimulante caracterizados por presentar en su estructura secuencias repetidas de CpG no metilados (CpG ODN)²² que actúan a través del TLR9²³. Las células B centro-germinales expresan típicamente esta última variedad de TLR, y son inducibles bajo la acción de ODNs²⁴.

Los inmunoestimulantes derivados de ácidos nucleicos conocidos hasta ahora, de los cuales se posee la mayor información sobre los efectos biológicos, son los polinucleótidos de 24 bases con motivos CpG no metilados²⁵. Durante los últimos años se han identificado ODNs con diferentes diseños y con similar actividad biológica²⁶. Particularmente, los que contienen repeticiones de timidina, mostraron una potente actividad inmunoestimulante independiente de los motivos CpG. Aún más, la metilación de los motivos CpG no causó la disminución de la actividad biológica de los ODNs.

Immunotech es una empresa argentina de desarrollo biotecnológico, que ha generado, estudiado y caracterizado recientemente un nuevo grupo de oligonucleótidos inmunoestimulantes muy potentes en humanos que no contienen motivos CpG. En esta experiencia se utilizó uno de estos ODNs (IMT-504) de 24 bases, cuya secuencia de nucleótidos está representada por:

5' TCATCATTITTTGTCATTTTGTCAAT 3'

El IMT-504 es el prototipo de los ODNs desarrollados por Immunotech. Este ODN se caracteriza por tener una acción directa sobre células B y células

dendríticas plasmacitoides, activándolas. Algunas de las respuestas a esta acción son: aumento de la expresión de moléculas coestimulantes (CD40, CD80, CD86, MHC clase I y II, etc.) en la superficie celular, secreción de IL6, IL10, IgM y en combinación con IL2 secreción de GM-CSF.

En estudios preliminares (no publicados), la principal acción "in vitro" del ODN IM504 sobre células leucémicas extraídas de pacientes con leucemia linfocítica crónica, fue la inducción de un fenotipo inmunogénico en las células CD5-CD19 positivas, caracterizadas por la expresión aumentada de CD40, CD80, CD86, que las haría potencialmente reconocibles por células T citotóxicas autólogas.

En el presente estudio se analizaron los cambios de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 después de la incubación con ODN504 en células CD5-CD20 positivas de pacientes previamente diagnosticados como leucemia linfática crónica de fenotipo B. Además se analizó la expresión de Anexina V y la morfología como expresión de apoptosis. Se correlacionaron con las características clínicas y con el estado mutacional del gen de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Desde marzo a julio de 2003, se tomaron muestras de sangre periférica de 20 pacientes con leucemia linfática crónica diagnosticada previamente según los criterios morfológicos y fenotípicos aceptados actualmente⁸. Los pacientes fueron informados de los propósitos de investigación del estudio y firmaron un consentimiento informado, garantizando especialmente el anonimato de sus datos.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa de los pacientes con LLC-B en el Servicio de Hematología de CEMIC, Buenos Aires, Argentina usando heparina sódica como anticoagulante. Las células mononucleares fueron aisladas en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO). Las muestras de sangre eran diluidas 1:2 en medio RPMI-1640 (PAA laboratories GmbH, Linz, Austria) y suplementadas con L-glutamina 2.0 mM y 50.0 µg/ml de gentamicina y 20 mM HEPES, y centrifugadas a 1000 cg por 40 minutos a 20 °C. Luego eran lavadas y resuspendidas en un medio suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Incubación con Oligonucleótidos

Los elementos mononucleares de ese modo separados, fueron comparativamente incubados con 3 ODNs

de 24 bases: a) IMT504 con motivo PyNTTTTGT: (TCATCATTTTGTCAATTTGTTCATT) sintetizado por IMMUNOTECH, b) ODN2006 con motivo CpG, c) ODN22 (TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA), un ODN previamente reconocido como no estimulantes y d) sin ODN, como control. Los ODNs b y c, fueron obtenidos de Oligos ETC (Bethel, Maine). Los ODNs fueron suspendidos en agua libre de pirógenos y mantenidos a -20 °C hasta su uso. Todas las incubaciones fueron hechas a 37 °C y en iguales concentraciones de 3,5 µg/ml de cada ODN estudiado.

Citometría de flujo

Después de 24 horas de incubación, se efectuaron determinaciones por citometría de flujo en las células CD5/CD19 positivas (Becton Dickinson, San Jose, CA) de los siguientes marcadores: CD20, CD40, CD80, CD86, MHC class I and MHC class II, con antisueros fluorescentes (Serotec, Raleigh, NC). La inducción de la apoptosis fue evaluada después de 40 horas de incubación, usando el método de Annexina V-fosfatidilserina (Serotec, Raleigh, NC). Las determinaciones efectuadas a las células incubadas sin ODNs fueron tomadas como datos basales para construir un índice de incremento. Los datos de citometría de flujo fueron efectuados en muestras de 20,000 células, con un FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). Los datos fueron analizados usando un programa de computación Win MDI, 2.8, Interface Flow Cytometry Application (Joseph Trotter Copyright 1993-1998).

Estado Mutacional de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas

Brevemente, se extrajo RNA total de las células leucémicas utilizando TriZOL reagent® (Invitrogen). Se obtuvo cDNA utilizando Superscript III™ (Invitrogen), poliT (Invitrogen) y 1-2 µg de RNA total, en un volumen de reacción de 20 µl. Con 1-2 µl de estos cDNA se realizaron tres PCR por paciente para amplificar las zonas variables de las cadenas V_H de las inmunoglobulinas. Para cada reacción se utilizó una mezcla de primers sense (VH1 a VH6) y un primer antisense específico que correspondía a cada una de las zonas constantes de cada Ig (IgG, IgM o IgA). La temperatura de *melting* utilizada dependió de cada primer. Utilizando los productos de aquellas reacciones que fueron positivas, como templado y previa purificación de los mismos con GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), se secuenciaron utilizando los primers sense y reverse que correspondían. Las muestras fueron secuenciadas utilizando el kit CEQ™ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter-USA) y el secuenciador automático CEQ 2000 (Beckman Coulter). Todos los primers

TABLA 1
Primers utilizados para la detección de mutaciones de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en células de pacientes con LLC-B

VH Primers Líder	
VH1 and VH7: ATGGACTGGACCTGGAGG	VH7: GGTGCAATCTGGGTCTGAGTT
VH2: CAC(GA)CTCCTGCTGCTGACCA	
VH3a: GCTGGGTTTTTCCTTGTTGC	CH Primers Isotipo-especificos
VH3b: ATGGAGTT(TG)GG(AG)CTGAGCTG	IgM: CAGGAGAAAGTGATGGAGTCC
VH4: GCTCCCAGATGGGGTCTCTG	IgG: GGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
VH5: CTCCTCCTGGCTGTTCTCC	IgA: GAGGCTCAGCGGAAGACCTT
VH6: CTGTCTCCTCCTCATCTTCC	
VH Primers Familia-especificos FR1	
VH1: GT(GA)CAGTCTGG(GA)(GC)CTGAGG	Otros primers:
VH2: AAACCCACA(CG)AGACCCTCAC	VH1 CTC ACC ATG GAC TGG ACC TGG AG
VH3: GGTCCTT(GT)AGACTCTCCTGT	VH2 ATG GAC ATA CTI TGT TCC ACG CTC
VH4: (CG)ACCCTGTCCCTCACCTGC	VH3 CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GG
VH5: AAAGCCCGGGGAGTCTCTG	VH4 ACA TGA AAC AYC TGT GGT TCT TCC
VH6: CCCTCGCAGACCCTCTCAC	VH5 ATG GGG TCA ACC GCC ATC CTC CG
	VH6 ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC

TABLA 2
Datos demográficos de la población de pacientes con leucemia linfática crónica estudiada

	N=20 pts
Edad media (rango)	63 (48-77)
Sexo (F/M)	8/12
Estadíos RAI	
0	8
1	4
2	5
3	1
4	2
Linfocitos media (rango)	48.900 (10.000 a 105.000)/mm ³
Esplenomegalia	5 (25%)
Adenopatías	6 (30%)
Tiempo de evolución previo, mediana (rango)	32 meses (3 a 120)

proviene de IMMUNOTECH SA y fueron sintetizados con el Oligo 1000 M (Beckman Coulter). Los primers utilizados fueron: (Tabla 1).

RESULTADOS

Datos demográficos

Ingresaron al estudio 20 pacientes con LLC-B. La edad media de los pacientes fue de 63 años (48 a 77). La relación femenino/masculino de la población fue 8/12. Al momento del ingreso los estadíos de RAI eran 0: 8 pts, 1: 4 pts, 2: 5 pts, 3: 1 pt, y 4: 2. El recuento promedio de leucocitos fue 48,900/mm³ (10,000 a 105,000). Se observó esplenomegalia palpable en 5 pts (25%) y adenopatías en 6 (30%) de los pacientes. Diez pacientes (50%) ya habían recibido quimioterapia por progresión de la enfermedad antes

del ingreso al estudio. La mediana de evolución previa en meses fue de 32 (3 a 120). (Ver Tabla 2)

Expresión de las moléculas de superficie en células LLC-B, en respuesta al cultivo con PyTTTTGT ODN IMT504

Después de un período de incubación de 24 horas con los ODNs IM504, el ODN 2002 o el ODN IMT022 inactivo, el nivel de las moléculas de superficie, CD40, CD86, CD20 y MHC class I fueron evaluadas por citometría de flujo. En todos los casos, el ODN IMT504 y el ODN2002 produjeron un aumento de la expresión de CD40 (ver Figura 1), CD 80 y CD86 and MHC clase I molecules mientras que la expresión de CD20 permaneció sin cambios (Ver Figura 2). La actividad del ODN considerado inactivo IMT022, no se diferenció

TABLA 3
Índice de incremento de la expresión del marcador de superficie (estudiado/control) para los marcadores estudiados después de la incubación de células LLC-B con ODNs

Marcador de superficie	IM504 ODN PyNTTTTGT	2006 ODN CpG	IMT022 ODN Inactivo	Control Sin ODN
CD40	4.84 (1.44-9.20)	4.54 (1.40-9.38)	1.03 (0.87-1.10)	1
CD80	1.55 (1.23-2.41)	1.38 (1.10-2.36)	1.01 (0.91-1.05)	1
CD86	1.82 (0.9-3.8)	1.82 (0.9-3.80)	1.0 (0.90-1.05)	1
Anexina V	1.66 (0.77-2.61)	2.01 (1.07-2.61)	1.04 (0.93-2.00)	1

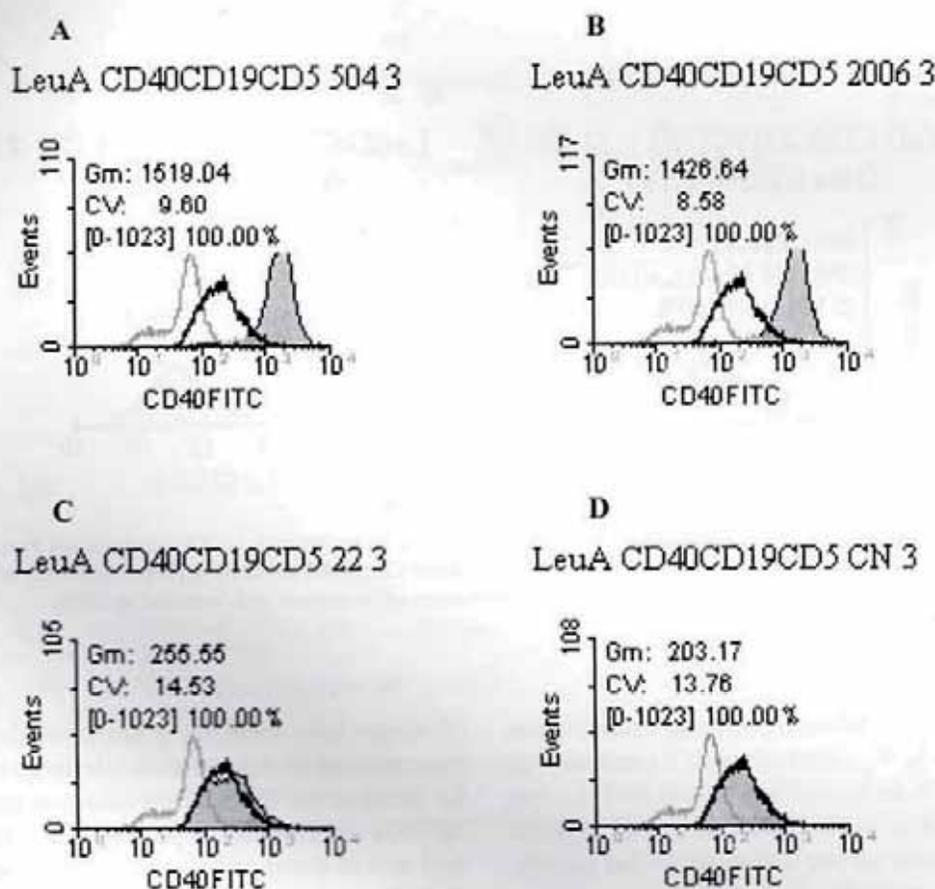


Fig. 1. Determinación de CD40 por citometría de flujo, en células de un paciente con LLC-B, incubados con Panel A) ODN IMT504 (PyNTTTTGT), Panel B) ODN2006 (CpG), Panel C) ODN022 (inactivo) y Panel D) Control. A y B muestran una expresión elevada de CD40 (área azul), C y D tienen baja expresión (similar) de CD40.

del control (Ver Tabla 3). En un paciente los índices de estimulación para CD40, CD80 y CD86 no pudieron efectuarse por la tendencia espontánea y rápida de las células LLC-B a entrar en apoptosis. La características clínicas del paciente eran las de una LLC "atípica" en un individuo joven, de morfología blástica, de considerable agresión clínica, anemia y esplenomegalia masiva. En la actualidad está siendo tratado con protocolos de LLA. El gen Ig VH no era mutado.

El estado mutacional de los genes Ig V_H de los pacientes ingresados al estudio

De doce pacientes se tiene la información del estado mutacional del Ig V_H (al momento de la preparación de este manuscrito). Seis de 12 (50%) pacientes enrolados en el estudio tenían mas del 98% de homología con las células germinales en la secuencia de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (no mutadas) (Ver Tabla 4). Un

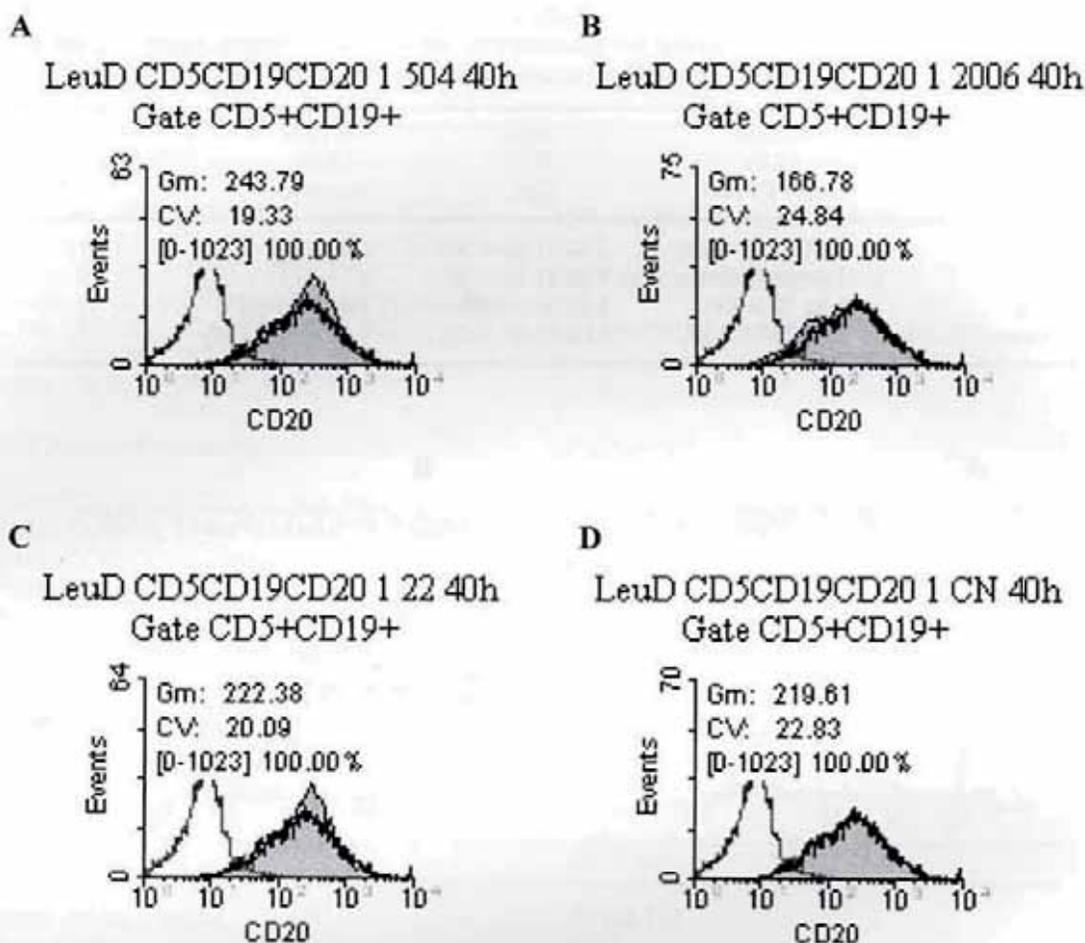


Fig. 2. Determinación de CD20 por citometría de flujo, en células de un paciente con LLC-B, incubados con Panel A) ODN IMT504 (PyNTTTTGT), Panel B) ODN2006 (CpG), Panel C) ODN022 (inactivo) y Panel D) Control. Ni los incubados con ODNs activos, el inactivo ni el control, mostraron un incremento en la actividad de CD20

paciente no pudo ser evaluado por tener una delección extensa en el gen Ig V_H, los restantes 5 pacientes tenían menos de 98% de homología (mutados). La respuesta media para la estimulación de la expresión de CD40 de estos casos no fue diferente en los pacientes no mutados y mutados ($p = 0.6$).

Efecto de la incubación con ODNs sobre la apoptosis de células LLC-B "in vitro"

Las células de la LLC-B tienen múltiples defectos en las vías apoptóticas y en parte por ese motivo se acumulan "in vivo". Pero cuando se cultivan "in vitro" pasan rápidamente a apoptosis. Los ODN CpG pueden modificar la apoptosis "in vitro" de un modo complejo. Se estudió el efecto del ODN prototípico PyTTTTTGT IMT504 sobre la apoptosis de células LLC-B "in vitro". La Fig. 2 resume los resultados obtenidos. El ejemplo A, muestra una respuesta típica de células B. Después de 40 horas de incubación "in vitro" más del 60% de las células permanecen intactas, entre el 15% y el 20% entran en apoptosis

(casillero bajo derecho) y aproximadamente la misma cantidad en necrosis (casillero derecho superior). La incubación de esas células normales con ODN IMT504 claramente las protege de la necrosis, mientras que la incubación con el control negativo ODN IMT022 no tiene ese efecto. El ejemplo B muestra un resultado típico observado en el 75% de las muestras celulares estudiadas. Estas células son más proclives a entrar en necrosis, presumiblemente a través de un rápido pasaje por un estadio apoptótico. Sólomente del 10% al 40% permanecen intactas después una incubación de 40 horas "in vitro". Cuando se incuban esas células LLC-B con ODN IMT504 se induce claramente apoptosis, pero se las "protege" del pasaje a necrosis. La incubación con el ODN IMT022 (inactivo) no tiene ese efecto. El ejemplo C muestra resultados típicos de un segundo grupo de células LLC-B. Estas células tienen una tendencia natural para entrar en apoptosis y necrosis después de 40 hs de incubación. Cuando la incubación se efectúa con con ODN IMT504 se induce apoptosis pero el pasaje

Tabla 4
Estado mutacional del gen Ig V_H de 12 pacientes con LLC-B, ingresados al estudio de incubación de células leucémicas con ODNs

Código de Paciente	Tipo de inmunoglobulina	Locus utilizados en el rearreglo V _H	Mutación Somática	Nº de mutaciones	Comentarios
212009	IgM	VH3 3-66; D3-10; JH6b	???? en duda	???? en duda	El locus D3-3 se encuentra asociado a un mal pronóstico, en general los pacientes están "no mutados" y según la bibliografía existe correlación de uso de este locus y trisomía de cromosoma 12 (Ver paper)
112010	IgM	VH4 4-59; D3-3; JH4b	no mutado	CDR1: 0 CDR2:0 FR1:0 FR2:0 FR3:1R	R: mutación que cambia el aminoácido; S: no cambia aminoácido
102001	IgM	VH3 3-73; D2-15 o D6-25; JH2	no mutado	CDR1: 0 CDR2: 1S FR1:3(1S y2R) FR2:1S FR3: 2(1S y1R)	
112011	IgA	-	n.d.	Nd	
212012	IgM	VH3 3-66; D3-3; JH6b	no mutado	CDR1:0 CDR2:0 FR1:1R FR2:0 FR3:1S	
112007	IgM		posee una delección	delección	
112013	IgM	VH4 4-04; D ?; JH4b	no mutado	CDR1: 0 CDR2: 3(1R y 2S) FR1: 2(1S y 1R) FR2: 0 FR3: 5(3R y 2S)	
112014	IgG	VH4 4-34; D ?; JH6b	mutado	CDR1:3(2R y 1S) CDR2: 2(1R y 1S) FR1:5 (2R y 3S) FR2:3(1R y 2S) FR3:7 (3R y4S)	
112015	IgM	VH4 4-34; D3-3; JH4b	no mutado	CDR1:1R CDR2: 1S FR1:3S FR2:0 FR3: 2 (1R y 1S)	
212016	IgM	VH3 3-30/3-30.5; D3-22/21-9; JH4b	mutado	CDR1: 1R CDR2:7 (5R y 2S) FR1:0 FR2:1R FR3: 9(7R y 2S)	
202008	IgM	VH1 1-02; D3-22/21-9; JH1	mutado	CDR1: 2R CDR2:1R FR1:2 (1R y 1S) FR2: 1R FR3: 3 (1R y 2S)	
112017	IgM	VH3 - (LSG 6.1); D3-3/DXP4; JH6b	no mutado	CDR1: 0 CDR2:2R FR1:0 FR2:0 FR3:4(2R y 2S)	

a necrosis continúa sin cambios. La incubación con el ODN022 (inactivo) no presenta ese efecto.

DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados demuestran que las células de la LLC-B, tienen una capacidad de respuesta *in vitro* a los ODNs sintéticos con motivos PyNTTTTGT que provocan un cambio fenotípico caracterizado por el aumento de la expresión de CD40, CD80 y CD86, genéricamente denominadas moléculas coestimuladoras. Ciertos componentes proteicos de las células neoplásicas, son degradados a péptidos intracelularmente durante el proceso de apoptosis. Estos, si no son reconocidos como propios, son expresados

en la superficie celular por el MCH clase II. Las moléculas coestimuladoras son indispensables para la interacción de las moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad Clase II, y los receptores T de los linfocitos T, que es el principio básico de la respuesta inmune adaptativa.

La inducción y el mantenimiento del período de apoptosis de las células LLC-B incubadas con el ODN IMT504, es un fenómeno que podría argumentarse como un posible futuro efecto terapéutico directo sobre las células LLC-B, que también puede tener un efecto indirecto a través del reconocimiento y fagocitosis por las células monocíticas-macrofágicas, digestión de sus proteínas y expresión de péptidos por parte de las células presentadoras de antígenos

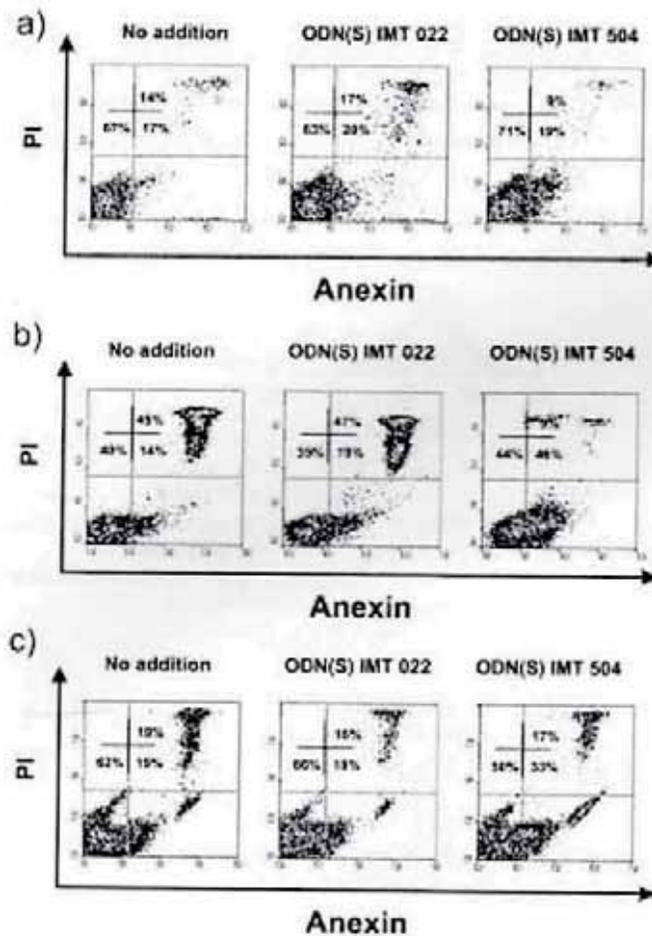


Figura 3. Efectos de la incubación de células de LLC-B con ODNs, sobre la expresión de Anexina V. Tres casos testigo.

y la consecuente expansión de los linfocitos T citotóxicos con especificidad contra la neoplasia B.

En esta serie pequeña de casos, ambos cambios fenotípicos (moléculas coestimuladoras y apoptosis) se produjeron indistintamente de la edad, sexo, número de leucocitos, estado de Rai, la necesidad de terapéutica previa, y del estado mutacional del gen IgV_H .

En el caso de la expresión de CD20, la misma no ha variado frente a la incubación con los diferentes ODNs, lo cual no daría sustento racional a su utilización con anticuerpos anti-CD20.

El ODN IMT504 ha sido estudiado farmacológicamente en tres especies animales, incluidos primates en nuestra institución (no publicado), sin identificar toxicidad a dosis 1000 veces más altas que las necesarias para lograr las concentraciones plasmáticas equivalentes a las de este experimento *in vitro*. Como consecuencia, se ha diseñado un estudio de fase I, con la administración parenteral de ODN IMT504 a pacientes con LLC-B con enfermedad avanzada, para confirmar que los cambios fenotípicos observados *in vitro*, se produzcan igualmente *in vivo*, y si esos cam-

bios tienen algún efecto biológico o clínico beneficioso en pacientes con LLC-B.

SUMMARY

Introduction: B-CLL cells are poor stimulators of T-cells because they usually have low expression of costimulatory molecules necessary for T-cell activation (CD40, CD80, CD86), even though they express MHC class I and II molecules. As a consequence, their unique surface Ig idiotype may escape immunological surveillance. ODNs bearing a CpG motif, stimulate B and plasmacytoid dendritic cells. Also, they up-regulate the expression of several co-stimulatory molecules in B-CLL cells and they induce direct apoptosis. Recently, it has been communicated that other ODNs, bearing PyNTTTTGT (Py: pyrimidine, N: any nucleotide) motifs are also able to stimulate human B and plasmacytoid dendritic cells.

Methods: In this study we investigated the effects of these novel ODNs regarding the expression of co-stimulatory molecules and apoptosis induction in human B-CLL cells. B-CLL cells (CD5, CD19 and CD20 positive) from 20 patients were comparatively incubated with the following 24mer ODNs: a) IMT504 bearing PyNTTTTGT motif, b) ODN2006 bearing CpG motif and c) ODN22, a non-stimulatory ODN as a control. All incubations were made at the same concentrations of the corresponding ODN. After 24 hrs of incubation, flow cytometric determinations in CD5/CD19 positive cells (Becton Dickinson, San Jose, CA) were made for CD20, CD40, CD80, CD86, expression with fluorescent antisera, (Serotec, Raleigh, NC). Apoptosis induction was evaluated after 40 hrs, using the Annexin V-phosphatidylserine method (Serotec, Raleigh, NC). Incubation without ODNs determinations were taken as baseline to build an increase index. Mutational status of Ig VH gene and complete clinical data were also obtained.

Results: Median increase index for CD40 was 4.84 (1.44-9.20); for CD80 was 1.55 (1.23-2.41); for CD86 was 1.82 (0.9-3.8) in B-CLL cells incubated with IMT504. Median increase index for CD40 was 4.54 (1.40-9.38); for CD80 was 1.38 (1.10-2.36); for CD86 was 1.82 (0.9-3.80) in the B-cells incubated with the ODN2006. Neither ODN2006, nor IMT504 increased the expression of CD20. Annexin V-phosphatidylserine expression index was 1.66 (0.77-2.61) and 2.01 (1.07-2.61) for IMT504 and ODN2006 respectively. ODN22 incubated B-CLL cells assays, for all cluster differentiation analysed, were similar to non ODN incubated controls. Mutational status and clinical correlations were also made.

Conclusions: Both, PyNTTTTGT ODNs and CpG ODNs are able to up-regulate co-stimulatory molecules in B-CLL cells and directly stimulate apoptosis in B-CLL cells of some patients. The results here presented strongly suggest the possibility that stimulation of B-CLL cells *in vivo* with some ODNs, may be an attractive immunotherapy for B-CLL. Our preclinical studies have shown that PyNTTTTGT ODNs are safe (unpublished) in three animal species, including non-human primates. Therefore, phase I/II clinical trials using these ODNs in B-CLL may be warranted.

Keywords: B-CLL; Oligodeoxynucleotide; biology Introduction

BIBLIOGRAFÍA

1. Kipps T. Immune and cell therapy of hematologic malignancies *International Journal of Hematology*. 2002;suppl 76:269-273.
2. Zent CS, Kyasa MJ, Evans R, Schichman SA. Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry data. *Cancer*. 2001;192(5):1325-30.
3. Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF, Dewald GW, Byrd JC, Farag S, Lucas M, Lin T. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am. Soc. Hematol Educ. Program)*. 2002;:193-213.
4. Aksentijevich I, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia: advances in biology and therapeutics. *Curr Opin Oncol*. 2003;Jan;15(1):16-22.
5. Segel GB, Woodlock TJ, Xu J, Li L, Felgar RE, Ryan DH, Lichtman MA, Wang N. Early gene activation in chronic leukemic B lymphocytes induced toward a plasma cell phenotype. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30(3):277-87.
6. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2003;4(3):211-8.
7. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, Pearson M, Young D, Reed JC, Byrd JC. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol* 2003; 21(8):1466-71.
8. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87:4990-4997.
9. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA, Stenson MJ, Witzig TE, Tefferi A, Kay NE. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(4):854-61.
10. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;15:1848-1854.
11. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023-9.
12. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-75.
13. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101(12):4944-51.
14. Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, Ceuppens JL. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*. 1997;11(4):572-80.
15. Wierda W, Cantwell M, Woods S, Rassenti L, Prussak C, Kipps T. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;96:2917-2924.
16. Ulevitch RJ. Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunol Res*. 2000;21(2-3):49-54.
17. Medzhitov R, Janeway C. Advances in Immunology: Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-344.
18. Delves P. J., Roitt I. M. Advances in Immunology: The Immune System— First of Two Parts. *N Engl J Med* 2000; 343:37-49.
19. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
20. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*. 2001;6(9):733-42.
21. Naumann M. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(8):1109-14.
22. Ashkar A, Rosenthal K. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med*. 2002;2(6):545-56.
23. Omar Duramad, Karen L Fearon, Jean H Chan, Holger Kanzler, Jason D Marshall, Robert L Coffman, and Franck J Barrat. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG containing immunostimulatory sequences. *Blood*, Prepublished Aug 2003; 10.1182/blood-2003-07-2465
24. Emer Bourke, Daniela Bosisio, José Golay, Nadia Polentarutti, and Alberto Mantovani The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*, 2003;02:956-963.
25. Zelenay S, Elias F, Flo J. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1382-92.
26. Elias F, et al. Strong Cytocine-Guanosine-Independent Immunostimulation in Humans and Other Primates by Synthetic Oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT Motifs. *J. Immunol.* (en prensa) 171(7), 2003