

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 305 245**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/13** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2002 E 02732970 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **02.09.2015 EP 1399559**

54

Título: **Locus de la cadena ligera lambda de ratón**

30

Prioridad:

**21.06.2001 GB 0115256**

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente modificada:  
**11.12.2015**

73

Titular/es:

**CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED (100.0%)  
Meditrina Building Babraham Research Campus  
Babraham Cambridge CB22 3AT, GB**

72

Inventor/es:

**BRÜGGEMANN, MARIANNE y  
ZOU, XIANGANG**

74

Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

## DESCRIPCIÓN

Locus de la cadena ligera lambda de ratón

5 La presente invención se relaciona con los ratones en los cuales el locus de la cadena ligera (L) endógena de ratón,  $\lambda$  (lambda) y/o los loci de la cadena  $\lambda$  y  $\kappa$  (kappa) han sido funcionalmente silenciados.

10 Las células B expresan inmunoglobulinas de superficie (Ig) tanto con cadena L  $\kappa$  (kappa) o  $\lambda$ , una selección la cual determina la exclusión del isotipo. La proporción de anticuerpos que contienen las cadenas L  $\kappa$  o  $\lambda$  varía considerablemente en las diferentes especies pero en el ratón solamente un pequeño porcentaje de anticuerpos expresa  $\lambda$ . Los genes de la cadena L son codificados por dos loci diferentes, los loci de la cadena L  $\kappa$  o  $\lambda$ , y el ratón tiene un extensivo número de genes V (variables)  $\kappa$  aguas arriba del gen 5 J (unión)  $\kappa$  y gen  $\kappa$  1 C (región constante). Aunque el locus  $\kappa$  es alrededor de 10 veces mayor que el locus  $\lambda$ , con más de 100 genes V, esta complejidad extensiva no es considerada como razón de que la mayoría de los anticuerpos de ratón porten cadena L  $\kappa$ . Puede ser que en el locus de ratón K son simplemente más eficientes los reordenamientos de ADN lo cual es apoyado por el hallazgo de que en la mayoría de las células con V  $\kappa$  reordenados el locus  $\lambda$  está aún en la configuración de la línea germinal mientras que en la mayoría de las células que expresan la cadena L  $\lambda$  el locus  $\kappa$  es tanto productivamente reordenado o suprimido.

20 Se han descrito algunas cepas de ratón con locus de cadena L  $\kappa$ . Se generaron por integración homóloga de un gen marcador selectivo en C  $\kappa$  o remoción diana de C  $\kappa$  o J  $\kappa$  (ver por ejemplo Zou, X. y otros, 1995, Eur. J. Immunol 25 (8): 2154-2162). Silenciando la expresión de la cadena L  $\kappa$  se pierde la ligera en la exclusión del isotipo y la activación de la cadena L y se concluyó que la expresión de  $\kappa$  y  $\lambda$  son eventos separados e independientes. Aunque los ratones homocigotos  $\kappa^{-/-}$  compensan la deficiencia de  $\kappa$  con la producción de  $\lambda$  incrementada sus células esplénicas B y células  $\mu^+$  en la médula ósea puede ser reducida comparado al ratón normal. Esto puede sugerir que el reordenamiento y expresión de la cadena L  $\lambda$  es quizás un proceso menos eficiente. Sin embargo, a pesar de la pérdida de la cadena L  $\kappa$  estos ratones son saludables y pueden mantener una eficiente respuesta inmune.

30 Durante el desarrollo de las células B los segmentos de genes que codifican las cadenas Ig H se reordenan primero por recombinación de D a JH en la etapa de pro células B. Esto es seguido por recombinación de VH a D-JH en la etapa de pre B-1 y si una cadena  $\mu$  H puede parearse con la correspondiente cadena L, que consiste en V<sub>preB</sub> y proteína  $\lambda$ 5, esta forma un receptor pre células B expresado en la superficie (pre BCR) y la etapa de diferenciación pre B-II. La expresión en la superficie de la célula del receptor pre BCR induce la proliferación y después algunas divisiones de las células grandes B-II se diferencian en pequeños restos de células pre B-II. La etapa de pre B-II con una definida relación de células pre B grandes y pequeñas han sido identificadas por la expresión en la superficie de la cadena  $\alpha$  del receptor IL-2, CD25. En la transición de pre B-II a célula B inmadura el reordenamiento V-J de la cadena L ocurre donde la correspondiente cadena L es reemplazada por  $\kappa$  o  $\lambda$ . En esta etapa las células pueden abandonar la médula ósea para diferenciaciones adicionales en las células del plasma o células de memoria los órganos linfoides secundarios tales como el bazo o nódulos linfáticos.

40 El desarrollo de las células B sin cadenas L no ha sido completamente dilucidado en el arte anterior. El BCR consiste en dos cadenas de IgH cada una asociada con una cadena L de Ig en conjunto con el correceptor Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ . Estas 6 cadenas tienen que ensamblarse correctamente en el retículo endoplasmático (ER) para permitir el transporte y la expresión de la IgM en la superficie celular para progresar al desarrollo de las células B. Las células B inmaduras sin cadena L no son mantenidas y pierden la IgH de la superficie, la expresión de Ig $\alpha$  o Ig $\beta$  conduce a reducir la señal de una actividad transductora la cual puede detener la maduración de las células B. La cadena H, sintetizada antes de la cadena L, es chaperoneada y retenida en el citoplasma pero si la asociación de la cadena L falla una simple cadena H, a pesar de las cadenas L, sufre una rápida degradación intracelular como resultado de un ineficiente transporte desde el ER a Golgi.

50 El locus de la cadena ligera lambda  $\lambda$  de ratón tiene alrededor de 200 kb de tamaño y comprende 3 regiones de genes variables (V) y 4 segmentos de unión (J) aguas arriba de 4 regiones de genes constantes (C), V2 - Vx - J2 - C2 - J4 - C4 - V1 - J3 - C3 - J1 - C1 (Fig. 1a). El silenciamiento de los locus  $\lambda$  es difícil porque la integración homóloga para suprimir o discapacitar un simple o aún dos genes C  $\lambda$  podría no ser suficiente para prohibir el reordenamiento y expresión de la cadena ligera  $\lambda$ . Para alcanzar esto podría tener que discapacitar 2 regiones C2 y C3-C1 las cuales son de alrededor de 100 kb aparte. C4 es considerada no funcional ya que no ha sido encontrada proteína. Esto significa que 2 construcciones diana tienen que ser ensambladas y homológamente integradas en el mismo alelo. Una ventaja podría ser el uso de sitios loxP integrados para permitir la delección mediada por Cre de los locus completos o la delección de genes funcionales pertinentes.

60 Existe por lo tanto la necesidad de producir ratones en los cuales el locus de la cadena ligera  $\lambda$  sea suprimido. Esto podría también ser atractivo para producir ratones que pierden las cadenas ligeras funcionales para la producción de ratones que producen solamente anticuerpos de cadena pesada - la explotación de ratones que producen anticuerpos humanos -, por ejemplo, es obstaculizada por el problema de que las cadena L lambda de ratón se asocian con una gran proporción de Ig humana expresada (o cadena H).  
WO 98/24884 está dirigido a animales transgénicos no humanos (especialmente ratones) capaces de producir

anticuerpos heterólogos.

El ejemplo 28 de WO 98/24884 es un ejemplo teórico e hipotético que describe dos posibles estrategias para la inactivación dirigida de los locus de cadena ligera  $\lambda$ :

5 En la primera estrategia, la delección de un segmento grande de 120 kb J $\lambda$ 2C $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 1C $\lambda$ 1 usando un reemplazamiento tipo vector diana y dependiendo de la recombinación homóloga para insertar un marcador selectivo tal como neo podría ser extremadamente difícil sino imposible de alcanzar. Aunque la misma estrategia fue reportada usada exitosamente en WO 98/24884 para lograr la delección diana de los locus JH, la secuencia del locus JH a ser suprimida y reemplazada por el gen neo fue solamente de unas pocas kilobases de tamaño. La propuesta de extrapolación de esta simple delección para la delección dirigida del segmento de 120kb J $\lambda$ 2C $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 1C $\lambda$ 1 puede no ser técnicamente alcanzable. Ciertamente, los inventores creen que nadie ha sido capaz de silenciar el locus de la cadena ligera de ratón A usando esta estrategia a pesar de que algunos grupos (de personas expertas) han intentado hacerlo.

15 En la segunda estrategia, se sugiere que las dos regiones, viz. J $\lambda$ 2C $\lambda$ 2/ J $\lambda$ 4C $\lambda$ 4 y J $\lambda$ 3C $\lambda$ 3/ J $\lambda$ 1C $\lambda$ 1, podrían ser independientemente suprimidas en las mismas células del sistema embrionario (ES) usando vectores diana tipo reemplazo. Otra vez, las regiones propuestas para la delección son cada una bastante grandes y es dudoso que cada delección pueda ser exitosamente ejecutada. La probabilidad de ir alcanzando independientemente dos de tales supresiones en la misma célula ES es aún baja. Otra vez, los presentes inventores creen que nadie ha sido capaz de silenciar el locus de la cadena ligera  $\lambda$  de ratón usando esta estrategia a pesar de los intentos que han sido hechos.

20 La WO 98/24884 no proporciona información suficiente y necesaria para la persona experta para ejecutar la invención actualmente reivindicada. La presente invención demuestra, en primer lugar, la producción actual de un ratón con el locus de la cadena ligera  $\lambda$  silenciado.

25 La WO 94/02602 describe la producción de anticuerpos xenogénicos en un huésped no humano, el cual preferiblemente no es capaz de producir cadenas pesadas de inmunoglobulinas endógenas y es sustancialmente incapaz de producir cadenas ligeras de inmunoglobulinas endógenas. Así los anticuerpos de WO 94/02602 podrían retener alguna actividad de cadena ligera endógena, ya que los métodos usados para producirlos son solamente 'sustancialmente incapaces' de producir cadenas ligeras de inmunoglobulinas endógenas. En contraste, los anticuerpos de la presente invención son producidos por un método que no produce cadenas ligeras de inmunoglobulinas endógenas, más bien justamente siendo 'sustancialmente incapaz' de hacerlo. Es más, los métodos generales para producir locus inactivados de inmunoglobulinas endógenas son completamente insuficientes describiendo los pasos detallados necesarios para producir anticuerpos de la presente invención. La WO 94/02602 discute en términos más generales dos amplias estrategias para la producción de tales anticuerpos. Como se discutió arriba la presente invención no es susceptible a tales técnicas de rutina y la delección exitosa de los loci relevante representa un reto técnicamente significativo. La WO 94/02602 no provee la información suficiente y necesaria para las personas expertas para producir anticuerpos de acuerdo a la presente invención.

30 La WO 96/33735 destaca el uso de un ratón en el cual las cadenas ligeras y pesadas están alteradas para la producción de anticuerpos humanos. Este documento se relaciona con WO 94/02602 para suministrar un ratón incapaz de producir cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas endógenas (los llamados 'Xenoratonos'). Por las mismas razones expuestas arriba este documento no provee la información suficiente y necesaria a las personas expertas para ejecutar la presente invención reivindicada.

35 Según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un ratón en el cual el locus de la cadena ligera  $\lambda$  está funcionalmente silenciado caracterizado en que el ratón tiene una delección de los genes de la cadena ligera  $\lambda$  seleccionados de la siguiente parte de la región del locus  $\lambda$ :

- (a) C2 y C3-C1; o
- (b) C2-C1 (es decir, C2-C4-C3-C1).

40 El ratón transgénico de acuerdo a la presente invención ha sido producido por primera vez por los presentes inventores. Los usos de tales ratones son descritos abajo.

45 El procedimiento ejemplificado de hacer el locus de la cadena ligera lambda endógena de ratón no funcional usó dos estrategias de silenciamiento de todos los genes de las regiones constantes: 1. integración de un gen marcador selectivo para discapacitar las regiones de genes constantes individuales y 2. delección de genes y locus. Como se describe además en la sección Experimental abajo, esto produjo dos cepas de ratón KO lambda,  $\lambda 1.3.2^{-/-} \kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-} \kappa^{-/-}$ , con esencialmente las mismas características del locus silente lambda. El silenciamiento de las cadenas ligeras lambda de ratón verificó la organización gen/locus y mostró que no participan genes adicionales parecidos a las cadenas L en el desarrollo de células B.

50 En una realización adicional de la invención, el locus de la cadena ligera  $\kappa$  del ratón puede ser funcionalmente

silenciado. Los ratones con delección (KO) completa de la cadena L, por ejemplo locus kappa y lambda silenciados por genes dianas, mostraron un bloqueo en el desarrollo de las células B en la etapa cuando la expresión de la cadena L tendría que haber sido completada. Estos ratones aún producen o expresan cadena  $\mu$  H. Ciertamente, es esperado que estos produzcan repertorios de cadenas pesadas de anticuerpos. Existe un amplio interés comercial en tales ratones porque 1) ellos son la primera cepa de ratones con el locus lambda silenciado y 2) con cruzamientos con las cepas existentes ellos podrían permitir producir ratones que no expresen cualquiera de las formas de cadena H o L.

En una realización adicional de la invención, el locus de la cadena pesada del ratón puede ser silenciado por el método de selección de genes (knock-out).

La  $\lambda$ ,  $\kappa$  y los locis de cadenas pesadas de ratón pueden ser eliminados o silenciados.

Aún en una realización adicional, los ratones pueden portar al menos un transgén el cual comprende uno o más genes pesados o locis y/o genes de cadena ligera o loci de especies heterólogas. El ratón puede producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente de especies heterólogas. Las especies heterólogas pueden ser humanas.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un ratón como es definido arriba para producir anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser producidos a través de procedimientos de inmunización. En una realización preferida, los anticuerpos son humanos.

También se proporciona un método de producción de un ratón como se definió arriba en el cual el locus de la cadena ligera  $\lambda$  es funcionalmente silenciado, comprendiendo el paso de la delección de al menos los genes de la región constante C1, C2 y C3 del locus de la cadena ligera  $\lambda$ . Los loci de C2-C4 y los loci C3-C1 pueden ser eliminados simultáneamente o secuencialmente. En una realización de la divulgación, son usadas las construcciones diana que se muestran en la Fig.1.

La invención será además descrita en la sección Experimental abajo con referencias a las figuras acompañantes, en las cuales:

**Figura 1** Muestra la integración diana y la delección de los locus de cadena L  $\lambda$ . a, El locus es ~200 kb con 2 grupos de genes J-C (J2-C2 J4-C4 y J3-C3-J1-C1) separados ~110 kb. Dos genes V, V2 y Vx, están localizados ~75 kb y ~56 kb aguas arriba de C2, respectivamente, y V1 está localizado ~20 kb aguas arriba de C3. La integración diana de C3-C1 inserta <sup>tk</sup>Neo-loxP dentro de C1 y loxP 3' de J3, esto permite la delección de C3, J1 y 5' CI. La construcción diana C2-C4 inserta loxP-<sup>tk</sup>Neo dentro de C2. Ambas construcciones diana incapacitan todos los genes C funcionales. Con la delección mediada por Cre la región entre C2-C1 es eliminada. b, Análisis de la integración diana y delección mediada por Cre. Southern blot del ADN de ratones normales (NM), ADN de células ES de clones con integración homóloga en C3-C1 (ES3.1) y C2-C4 (ES2.4), y la delección de C3-C1 (ES3.1 $\Delta^{+/-}$  y 3.1 $\Delta^{-/-}$ ) con digestiones y sondas indicadas (A,B,C,D). El análisis PCR del ADN de la cola identificó la configuración del locus de la Igl antes y después de la delección de Cre. Los oligonucleótidos (1-6, ver debajo) son indicados por flechas y las bandas resultantes del PCR son el producto de las combinaciones de oligo usadas indicadas por sombreado. Los sitios de restricción usados para el análisis son B, BamHI; H, HindIII; R, EcoRI; S, SacI; X, XhoI; Xb, XbaI;

**Figura 2** Muestra el análisis de la citometría de flujo de a, médula ósea y b, poblaciones de células B esplénicas de ratones normales (NM),  $\kappa^{-/-}$ ,  $\lambda 1^{-/-}\kappa^{-/-}$ ,  $\lambda 1.3^{-/-}\kappa^{-/-}$ ,  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$ . Los perfiles son representativos para los resultados obtenidos de al menos 5 ratones por grupo y muestra teñimiento de los linfocitos de la médula ósea con c-kit conjugado PE, anti ratón conjugado con biotina CD43, antiratón conjugado con biotina CD25 o anti IgM conjugado con biotina en combinación con PE- o anti B220 conjugado APC. Las células del bazo fueron teñidas con anti IgM conjugado con biotina, anti IgD conjugado con FITC o anti  $\lambda$  conjugado con FITC, y/o anti  $\kappa$  conjugado con PE y anti B220 conjugado con APC para el agrupamiento de la puerta de linfocitos B;

**Figura 3** Muestra el teñimiento de la superficie y citoplasmático de células b de la médula ósea CD25 de  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  y ratón normal (NM). A, tinción citoplasmática y separadamente de la superficie con anti- $\mu$  acoplado con FITC. B, la separación de las células B de acuerdo a su tamaño;

**Figura 4** Muestra el análisis de la citometría de flujo de células B y T en el peritoneo de ratones  $\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$ . Las células fueron teñidas con anti CD5 conjugado con PE y anti B220 conjugado con APC; y

**Figura 5** Muestra la separación en gel de los anticuerpos del suero y citoplasma de  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  (L KO) y ratones normales (NM) capturados con anti- $\mu$ .

## Parte experimental

Aquí se muestra que los ratones con los loci de la cadena L silenciados son inmunodeficientes. Estos no producen células B-1 o B-2 en la periferia y el desarrollo de las células B está comprometido en la etapa inmadura de células B con un completo bloqueo en la etapa de diferenciación cuando el reordenamiento de las cadenas L podría haber sido completado.

Para analizar la importancia de la expresión de la cadena ligera (L) para el desarrollo de anticuerpos en ratones mutantes con delección dirigida del locus  $Ig\lambda$  fueron generados y cruzados con ratones portadores de un locus no funcional  $Ig\kappa$ . Silenciamientos sucesivos de los genes de origen  $C\lambda$  y  $\kappa^{-/-}$  mostraron una reducción de los niveles de las células B maduras y animales con los genes de la cadena L silenciados, ejemplo ratones  $\lambda^{-/-}\kappa^{-/-}$ , no expresan polipéptidos de Ig. Sus bazo están desprovistos de células B y ninguna de las células B-1 o B-2 están presentes mientras el número de células T permanece normal. Las células pro y pre B son solamente ligeramente reducidas y los niveles de CD25<sup>+</sup> de las células pre B-II grandes y pequeñas son principalmente retenidos. En ratones  $\lambda^{-/-}\kappa^{-/-}$  el desarrollo de células B parece ser esencialmente no comprometido hasta la etapa inmadura. Sin embargo, un completo bloqueo es evidente cuando debería ser completado el reordenamiento de la cadena L, resultando en la expresión de la IgM de superficie. La pérdida de la cadena L evita la asociación BCR y la función de la cadena L no puede ser sustituida (ejemplo por cadena ligera correspondiente). Fue inesperado que la pérdida de la cadena L no tuviera un profundo efecto en el desarrollo de las células precursoras, tal como la acumulación de células pre B-II en la etapa de transición de las células pre B a células B inmaduras.

## Materiales y Métodos

*Construcciones diana.* Una librería de fagos  $\lambda$  derivados de ADN de células ES, un amable obsequio de A. Smith y T. Rabbitts (Laboratorio de Biología Molecular, MRC, Cambridge, UK) fue hibridizado con una sonda  $V\lambda$  y  $C\lambda$  (clon # 505 amablemente proporcionado por M. Neuberger, MRC, UK) los cuales identificaron algunos clones conteniendo  $V\lambda$  y separadamente, genes  $C\lambda$ . Parte de las regiones C2-C4 y C3-C1 fueron subclonadas en pUC19 para ensamblar las construcciones y obtener las sondas de genes. Esto permitió la inserción del extremo de *loxP* de pGEM-30 (Gu, H. y otros, 1993, Cell 73: 1155-1164) en el sitio 3' Hind III de J3, inserción *loxP* en <sup>tk</sup>Neo (Stratagene, La Jolla, CA) y la inserción final del extremo de <sup>tk</sup>Neo-*loxP* dentro de  $C\lambda 1$ , y *loxP*-<sup>tk</sup>Neo, derivado de pGH-1 (Pgem-30 y pGH-1 fueron amablemente proporcionados por H. Gu, Instituto de Genética, Universidad de Colonia, Alemania), dentro de  $C\lambda 2$  (ver figura 1a). Las construcciones diana de 14 kb C3-C1 fueron obtenidas por digestión XhoI y Hind III y las construcciones diana de 13kb C2-C4 fueron obtenidas por excisión XhoI en el sitio interno del polilinker. Sitios de restricción para la integración de <sup>tk</sup>Neo (SacI y BamHI) o *loxP* (Hind III) en las construcciones diana no fueron mantenidas.

*Análisis de la integración homóloga.* Los métodos usados para la electroporación de las construcciones diana y la selección de las células ES han sido descritos (Zou, X. y otros, 1995, supra). La construcción C3-C1 fue integrada en HM-1 (Selfridge, J. y otros, 1992, Somat. Cell Mol. Genet. 18:325-336) y C2-C4 fue integrado en células ES  $\lambda$ ES3.1 $\Delta$ -5. La diana C3-C1 fue identificada con fragmentos de Hind III de 0.4 kb (sonda A, las sondas están marcadas en la figura 1a) y digestiones SacI, Hind III y BamHI las cuales también permitieron la identificación de la delección de C3-C1 Cre-*loxP*. La integración homóloga en C2-C4 fue identificada con fragmentos de Hind III-XbaI de 0.7 kb (sonda C, el sitio XbaI está inmediatamente 5' de SacI) y fragmento Hind III-BamHI de 1.2kb (sonda D), y Hind III y digestiones BamHI de ADN de células ES. Para obtener la delección del locus  $\lambda$  el plásmido Cre pBS185 (GIBCO, #10347-011) fue transcientemente integrado por electroporación (Zou, X. y otros, 1995, supra). Los clones fueron evaluados por PCR usando los siguientes oligonucleótidos (flechas 1-6 en la fig. 1a):

C1rev 5'-GCCTTTCCCATGCTCTTGCTGTCAGGG-3' (SEC ID N° : 1) (< 1);  
 C1for 5'-CCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCC-3' (SEC ID N° : 2) (2>);  
 3'J3for 5'-CCCAGGTGCTTGCCCCACAGGTTTAGG-3' (SEC ID N° : 3) (3>);  
 5'C2for 5'-GGAGATCAGGAATGAGGGACAAAC-3' (SEC ID N° : 4) (4>);  
 3' <sup>tk</sup>Neorev 5'-CTCGACGGATCCGTCGAGGAATTCC-3' (SEC ID N° : 5) (<5 neo); y  
<sup>tk</sup>Neofor 5'-ATGGCCGATCCCATATTGGCTGCAGGG-3' (SEC ID N° : 6) (neo 6>).

Oligos 1-2 y por separado identificaron la integración de la construcción 4-5 mientras la combinación de oligos 1-3 y 1-4 identificaron parcial o completamente la delección de los genes C. Las reacciones de PCR fueron ejecutadas bajo las siguientes condiciones: dos ciclos iniciales de 45 segundos a 97°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C seguido por 30 ciclos con 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, y 10 minutos para completar la reacción.

*Derivación de ratones.* La transmisión de la línea germinal y de ratones quiméricos fue obtenida como se describe (Hogan, B y otros, 1994a, en Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p253-289. Ratones  $\lambda 1.3$ , en el fondo 129/Ola Balb/c, fueron apareados con ratones 129/Ola de 5 generaciones y cruzados con ratones Cre y cada uno para obtener ratones homocigotos  $\lambda 1.3^{-/-}$ . A partir

de la derivación de las células ES, los blastocitos fueron colectados y cultivados en células alimentadoras tratadas con mitomicina C (Hogan, B. y otros, 1994b, En: Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p217-251). Algunas líneas celulares ES fueron obtenidas y una línea de hembra  $\lambda$ ES3.1 $\Delta$ -5, fue usada para la integración de la construcción diana C2-C4.

Para la derivación de ratones transgénicos que expresan la proteína Cre de manera ubicua, el plásmido Cre pBS185 fue linearizado y purificado usando el kit para la purificación de ADN (Qiagen #28304). El ADN fue microinyectado dentro del pronúcleo de embriones masculinos F1 (CBax C57B1/6) de acuerdo a métodos estándares (Hogan, B. y otros, 1994b, supra) y algunos fundadores fueron producidos, dos de los cuales mostraron un alto nivel de delección de gen/locus cuando se cruzaron con ratones *loxP*.

*Análisis de citometría de flujo.* Para el análisis de las poblaciones de células B por citometría de flujo células de diferentes tejidos fueron preparadas y teñidas con varias combinaciones de anticuerpos marcados diferentemente contra marcadores celulares de superficie (ver Fig. 2): estos fueron para células de la médula ósea antiratón conjugado con PE c-kit (CD 117) (09995B; PharMingen), Ficoeritrina (PE)- o antiratón CD45R conjugado con alofococianina (APC) (B220) (01125A;01129A, PharMingen, San Diego, CA), antiratón CD25 conjugado con Biotina (01092A; PharMingen), monoclonal de rata anti IgM de ratón conjugado con FITC (cadena  $\mu$  específica, 04-6811; Zymed) y/o anti ratón CD43 conjugado con Biotina (01602D; PharMingen); para células del bazo antiratón CD45R conjugado con APC (B220) (01125A,01129A; PharMingen), anti IgM de ratón conjugado con Biotina (cadena  $\mu$  específica, 02082D; PharMingen ) anti IgD de ratón conjugado con FITC (02214D; PharMingen) anti Ig $\lambda$  de ratón (02172D,02174D; PharMingen) y/o anti Igk de ratón conjugado con PE (559940, PharMingen): y para células peritoneales anti CD5 de ratón conjugado con PE (Ly-1) (01035A; PharMingen) y anti CD45R de ratón conjugado con APC (B220) (01125A, 01129A; PharMingen).

Para la tinción citoplasmática, células B de la médula ósea fueron pretratadas usando un kit de permeabilización celular perm y fix (GSA-004, Caltag) y luego teñidas con anti IgM de ratón conjugado con FITC (cadena  $\mu$  específica, 04-681; Zymed), antiratón CD45R conjugado con PE (B220) (01125A, 01129A; PharMingen) y antiratón CD25 conjugado con Biotina (01092A; PharMingen) de acuerdo al protocolo del fabricante. La unión de los anticuerpos biotinilados fue desarrollada con streptovidina roja cuántica (S2899; Sigma) o streptovidina tri-color (SA 1006, Caltag, Burlingame).

*Análisis de proteínas.* Los anticuerpos del suero fueron identificados por ELISA como se describió (Zou, X. y otros, 1995, supra). Para la separación en geles de poliacrilamida los lisados digitoninas de células de la médula ósea (Bell, S. E. et al.,1994, EMBO J.13 (4): 816-26) y separadamente, el suero fue incubado por 1 hora a 4°C con anti IgM de ratón (cadena  $\mu$  específica, The Binding Site, Birmigham,UK) acoplado con Sepharose 4B activada con CNBr (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) como se describió (March, S. C. y otros, 1974, Anal. Biochem. 60: 149-152). Las muestras fueron fraccionadas en 4-15 % de geles profundos (161-1104, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) y después transferidos a membranas de nitrocelulosa, incubados con  $\mu$  antiratón biotinilado (B-9265, Sigma) durante 1 hora a RT y luego colocadas en la solución de peroxidasa de rábano con streptovidina biotiniladas (HRP) (RPN 1051, Amersham) durante 30 minutos en un zaranda. Las bandas fueron visualizadas con el sustrato luminiscente SuperSignal West Pico (34080, Pierce, Illinois).

## Resultados

*Silenciamiento del locus de las cadena L  $\lambda$  de ratón.* Para investigar el desarrollo de las células B sin la cadena L se produjeron ratones con el locus Ig  $\lambda$  eliminado. Los ratones  $\lambda^{-/-}$  fueron cruzados con animales portando el locus Igk no funcional, también obtenidos por genes dianas (Zou, X. y otros, 1995, supra). El locus de la cadena L  $\lambda$  de ratón contiene 3 regiones de genes V (variables), 4 segmentos J (unión) y 4 regiones de genes C (constantes) los cuales pueden independientemente reordenarse y expresar 3 cadenas L  $\lambda$  diferentes. No se encontró que C4 fuera expresada. El silenciamiento del locus  $\lambda$  fue llevado a cabo en 4 etapas sucesivas por introducción de secuencias de 3 *loxP* y dianas de C1 y C2 (Fig. 1a). La introducción de construcciones dianas C3-C1 silenciaron C1 y ratones de transmisión a la línea germinal fueron producidos los cuales, al aparearse con expresores Cre ubicuos, tuvieron C3-C1 eliminados en ambos alelos. Tales ratones, reproducidos dentro del fondo 129/Ola, fueron usados para la derivación de células embrionarias germinales (ES) con integración homóloga permitida y silenciamiento de C2. Ratones con transmisión de la línea germinal fueron obtenidos y se reprodujeron con expresores Cre y cada uno resultó en animales homocigóticos con una delección de C2 a C1 de ~120 kb. Análisis de células ES y ratones por Southern Blot y PCR, con ejemplos representativos mostraron en la Fig. 1b, la integración homóloga identificada y la delección del locus y resultó en animales separados con los siguientes genes silenciados a)  $\lambda$ C1 $^{-/-}$  (ratón 130 = ES1.3), b)  $\lambda$ C1 $^{-/-}$  y  $\lambda$ C3 $^{-/-}$  (ratón 1.3 = ES1.3 $\Delta$ ), c)  $\lambda$ C2 $^{-/-}$  y  $\lambda$ C3 $^{-/-}$  (ratón 50 = ES2.4) y c) delección de  $\lambda$ C1 $^{-/-}$ ,  $\lambda$ C2 $^{-/-}$ ,  $\lambda$ C3 $^{-/-}$  y  $\lambda$ C4 $^{-/-}$  (ratón 1.3-2.4 $\Delta$ ). Estas cepas de ratones fueron cruzadas dentro del fondo de  $\kappa^{-/-}$  y denominadas de acuerdo a su genes C silenciados o eliminados ( $\Delta$ ):  $\lambda$ 1 $^{-/-}\kappa^{-/-}$ ,  $\lambda$ 1.3 $^{-/-}\kappa^{-/-}$ ,  $\lambda$ 1.3.2 $^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda$ 1-2 $\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$ . La delección del locus  $\lambda$  fue verificado por secuenciación de fragmentos de PCR de 686 pb mostrado en la fig. 1b el cual contiene la región 3'J2 y 3' C1 separadas por *loxP*.

*Reducción de las células B en la delección del gen C  $\lambda$ .* Los ratones con genes C  $\lambda$  silenciados individualmente en el fondo  $\kappa^{-/-}$  mostraron significativamente números reducidos de células B maduras IgM $^{+}$  comparadas con los ratones

normales mantenidos en las mismas condiciones libres de patógenos (Tabla 1). Los anticuerpos de suero en  $\lambda 1^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1.3^{-/-}\kappa^{-/-}$  fueron también reducidos pero comparables con aquellos en ratones  $\kappa^{-/-}$  (Zou, X. y otros, 1995, supra). Inesperadamente ratones  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  derivados de hembras heterocigóticas o madres adoptadas tuvieron títulos de anticuerpos significativos en el suero aún detectables por ELISA 6 semanas después del destete.

5 Sin embargo, los análisis de suero de tales ratones después de 3 meses no mostraron anticuerpos remanentes (datos no mostrados). La pérdida de Ig de suero en ratones  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  confirmó que  $\text{C}\lambda 4$  tiene que ser pseudogen que los genes  $\text{V}\lambda$  remanentes no pueden ser expresados usando un gen C todavía desconocido. La reducción del nivel de células B en la médula ósea y el bazo a cada etapa de silenciamiento sucesiva es mostrado en la Fig. 2 y la

10 Tabla 1. En la médula ósea el desarrollo de las células pro y pre-B parece estar un poco afectado por la pérdida de la expresión de la cadena L y los niveles de  $c\text{-kit}^+$ , las células B  $\text{CD}43^+$ , y  $\text{CD}25^+$  son bastante similares en las cepas KO y comparadas con los ratones normales (Fig. 2a). Sin embargo, en la etapa cuando el reordenamiento de la cadena L debería haber sido completado el desarrollo normal es bloqueado y las células B inmaduras fallan para expresar la IgM de superficie. De manera interesante, es claramente visible una reducción en el número de células que expresan la IgM de superficie y, comparado al 12 % de IgM de linfocitos  $\text{B}220^+$  en la médula ósea de ratones normales, 4 % son encontrados en ratones  $\kappa^{-/-}$ , 2 % en ratones  $\lambda 1^{-/-}\kappa^{-/-}$ , 1 % en  $\lambda 1.3^{-/-}\kappa^{-/-}$  y esencialmente ninguno en ratones  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$ . En el bazo los niveles de células B  $\text{Ig}^+$  en ratones  $\lambda 1^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1.3^{-/-}\kappa^{-/-}$  son similares a aquellos en ratones  $\kappa^{-/-}$  mientras que en ratones  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  solo una tinción de fondo es remanente (Fig. 2b).

Para evaluar si las células B  $\text{B}220^+$  en la médula ósea acumulan cadena H  $\mu$  en el citoplasma y si esas células migran a órganos linfoides secundarios se tiñó para el IsM citoplasmático. Como se muestra en la figura 3a las células B de la médula ósea  $\text{CD}25^+$  provenientes de ratones  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  ciertamente se tiñen para la cadena H  $\mu$  citoplasmática pero no muestran teñimiento para la IgM de superficie. Ciertamente los niveles de células B  $\text{CD}25^+$  y su distribución de tamaños es muy similar en ratones normales y L KO (Fig. 3b). Sin embargo, la migración de estas células a, por ejemplo, el peritoneo no tiene lugar y la Fig 4 muestra que esencialmente ninguna célula B existe en los órganos linfoides secundarios. Hubo sorpresa porque la cadena H  $\mu$  identificada en el citoplasma de las células B de los ratones  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  es del mismo tamaño o peso molecular que la cadena H  $\mu$  convencional. La lisis celular usando digitonina y capturando las cadenas H  $\mu$  enlazadas y no enlazadas, analizadas en geles de poli(acrilamida) (Fig.5), no mostró diferencias de tamaño de la cadena H  $\mu$  producida en el citoplasma de ratones silenciada de cadena L o normal. Sin embargo, como se mostró también en la Fig. 5 la Ig de suero no es producida por esos ratones. Esto re-enfatiza que el desarrollo de las células B y la expresión de la cadena H  $\mu$  hasta la etapa cuando las cadenas L son expresadas parece no ser ampliamente afectada en ratones KO de cadena L. Además, la pérdida de la cadena L evita la liberación de la cadena H  $\mu$  desde la célula lo cual evita la secreción de Ig.

*Bloqueo en el desarrollo en la etapa de células B inmaduras.* El silenciamiento de los genes de la cadena L  $\lambda$  en el fondo de  $\kappa^{-/-}$  mostró que no es producida Ig secretada ni de superficie y que el bloqueo resultante en el desarrollo de las células B está establecido en la fase de transición de preB II a inmadura. En esta etapa la expresión de  $\text{CD}25$  es revocada, el pre BCR es reemplazado por el BCR, la cadena L no es expresada y el reordenamiento de la cadena L  $\kappa$  o  $\lambda$  es completado con la expresión exitosa que permite la asociación de la cadena H  $\mu$ . Después de algunas divisiones las células pre B-II de  $\text{CD}25^+$  grandes se diferencian en células pre B-II que mantienen  $\text{CD}25^+$  pequeños las cuales están en el proceso de reordenamiento de sus genes de cadena L. Como puede ser observado en la Fig. 2a el número de células  $\text{CD}25^+\text{B}220^+$  en la etapa inmediatamente antes del bloqueo desarrollado es muy similar. Como el reordenamiento exitoso de la cadena L es evitado o impedido en los ratones mutantes hubo sorpresa porque este bloqueo altera la relación de células  $\text{CD}25^+$  pequeñas y grandes. En la Fig.3b el número de células de la médula ósea  $\text{CD}25^+$  de ratones  $\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$ , normales de edad similar es trazado contra el tamaño celular. La comparación muestra ligeras variaciones como se esperaba pero no diferencias importantes en las poblaciones de células pre B-II grandes y pequeñas. Esto concluye que la falla para expresar cadenas L inicia un completo bloqueo en el desarrollo de la etapa de células B inmaduras cuando la IgM de superficie debería ser expresada. Además no se acumulan células B inmaduras antes del evento.

Este bloqueo en el desarrollo con recobrados no evidentes impide la expresión IgM de superficie y la subsecuente migración celular. Como se muestra en la Tabla 1 el número de células del bazo en ratones  $\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$  y  $\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$  es significativamente reducida. Una pérdida completa de las células B maduras es también encontrada en la cavidad del peritoneo con células no  $\text{B}220^+$  y  $\text{B}220^+\text{CD}5^+$ . (Fig.4). Esta pérdida de células B-1 y B-2 parece no tener efecto en los niveles de células T las cuales son mantenidas.

## Discusión

Los experimentos mostraron que el desarrollo de las células B es abortado en los ratones con la delección de la cadena L en la etapa de transición de células B pre BII a inmaduras cuando la expresión del receptor de superficie debería haber sido lograda. Este completo bloqueo en el desarrollo evita la maduración de las células B y el ratón es inmunodeficiente con respecto a las células B que expresan anticuerpos. La cadena L correspondiente codificada por  $\text{VpreB}$  y  $\lambda 5$  no sostiene el desarrollo de células B y con la falla para expresar polipéptidos de la cadena L la diferenciación de células B cesa exactamente en la etapa cuando el reordenamiento de la cadena L debería haber sido completado. Esto re-enfatiza la importancia de la cadena L para el desarrollo inmune y que, al menos en el ratón, no hay gen o eventos de rescate que puedan compensar la deficiencia de la cadena L.

El desarrollo de las células B en el ratón ha sido ampliamente estudiado por la selección de genes y uno de los primeros experimentos un exón transmembrana  $\mu$  fue declarada no funcional lo cual evita la expresión de IgM de superficie. Esta  $\mu$ MT KO causó un bloqueo en el desarrollo conduciendo a la acumulación de células pre B-I y la desaparición de células pre B-II. Con la pérdida de la expresión de la IgM de superficie no fue obtenida proliferación o diferenciación en las células B inmaduras o maduras, sin embargo, el reordenamiento de ADN fue mantenido. Ciertamente los ratones  $\mu$ MT reordenan los genes de cadenas H y L mientras que los ratones KO de cadena H sin segmentos J mantienen el reordenamiento de la cadena L. Esto está de acuerdo con los resultados de los ratones  $\lambda^{-/-}\kappa^{-/-}$  los cuales muestran reordenamiento de la cadena H y la expresión citoplasmática de Ig $\mu$  lo que reitera que la expresión y el reordenamiento de las cadenas H y L son eventos independientes. La importancia crítica del BCR en la progresión normal y señalización del desarrollo a través de las etapas de maduración de las células B fue además analizado por la selección de genes de componentes individuales BCR. Los resultados mostraron que el silenciamiento de algunos genes, tal como el locus de la cadena L Ig $\kappa$ , tuvo un efecto moderado en el desarrollo de las células B y es bien tolerado mientras que la función de otros genes, tales como C $\mu$  o Ig $\beta$ , es esencial y bloquea cualquier progreso en el desarrollo. El bloqueo en el desarrollo de las células B fue frecuentemente acompañado por la acumulación de células antes de la etapa de diferenciación cuando el gen silenciado debería estar activo. Sorprendentemente esto no fue observado en ninguna etapa de células B pre o pro en ratones  $\lambda^{-/-}\kappa^{-/-}$  y los números de células B grandes y pequeñas CD25<sup>+</sup> inmediatamente antes del bloqueo en el desarrollo son similares a aquellos encontrados en ratones normales. Una razón para esto puede ser que las células que entran a la etapa de pre B-II y aquellas apoptóticas, quizás la mitad de las células CD25<sup>+</sup> generadas en la médula ósea mueren sin madurar en células B IgM<sup>+</sup>, permitiendo mantener los niveles de células bastante constantes.

La importancia de la expresión de la cadena L ha sido estudiada en ratones KO RAG-1 y RAG-2 donde el desarrollo de células B es detenido en la etapa de células pro B B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>. Con la introducción de un reordenamiento de la cadena H Ig $\mu$  fue expresado en el citoplasma lo cual está de acuerdo con la observación de que la cadena L facilita la disociación de la proteína de unión de la cadena H y el transporte a la superficie celular. Sin embargo, para dirigir el desarrollo de la población celular de la línea B en ratones RAG<sup>-/-</sup> ambos reordenamientos de los genes de las cadenas H y L tuvieron que ser introducidos. En la médula ósea de ratones RAG-1<sup>-/-</sup> $\lambda$ 5<sup>-/-</sup> que portan una transmisión de cadena H reordenada de células pro B a pre B y la expresión de la IgM de superficie fue solamente observado cuando ambos  $\lambda$ 5 o una cadena L reordenada fueron introducidos. Nussenzweig y colaboradores argumentaron que cuando ninguna cadena L convencional ni  $\lambda$ 5 son expresadas el desarrollo de las células B no puede proceder pasada la etapa de células pro B. Esto no ha sido observado en los ratones con el locus de la cadena ligera  $\lambda$  y  $\kappa$  silenciados donde el desarrollo de las células B permite la expresión de la cadena pesada y el progreso desarrollado a la etapa de células pre B-II.

Tabla 1 Número de células en el bazo y médula ósea de ratones normales,  $\kappa^{-/-}$  y eliminación de C $\lambda$ .

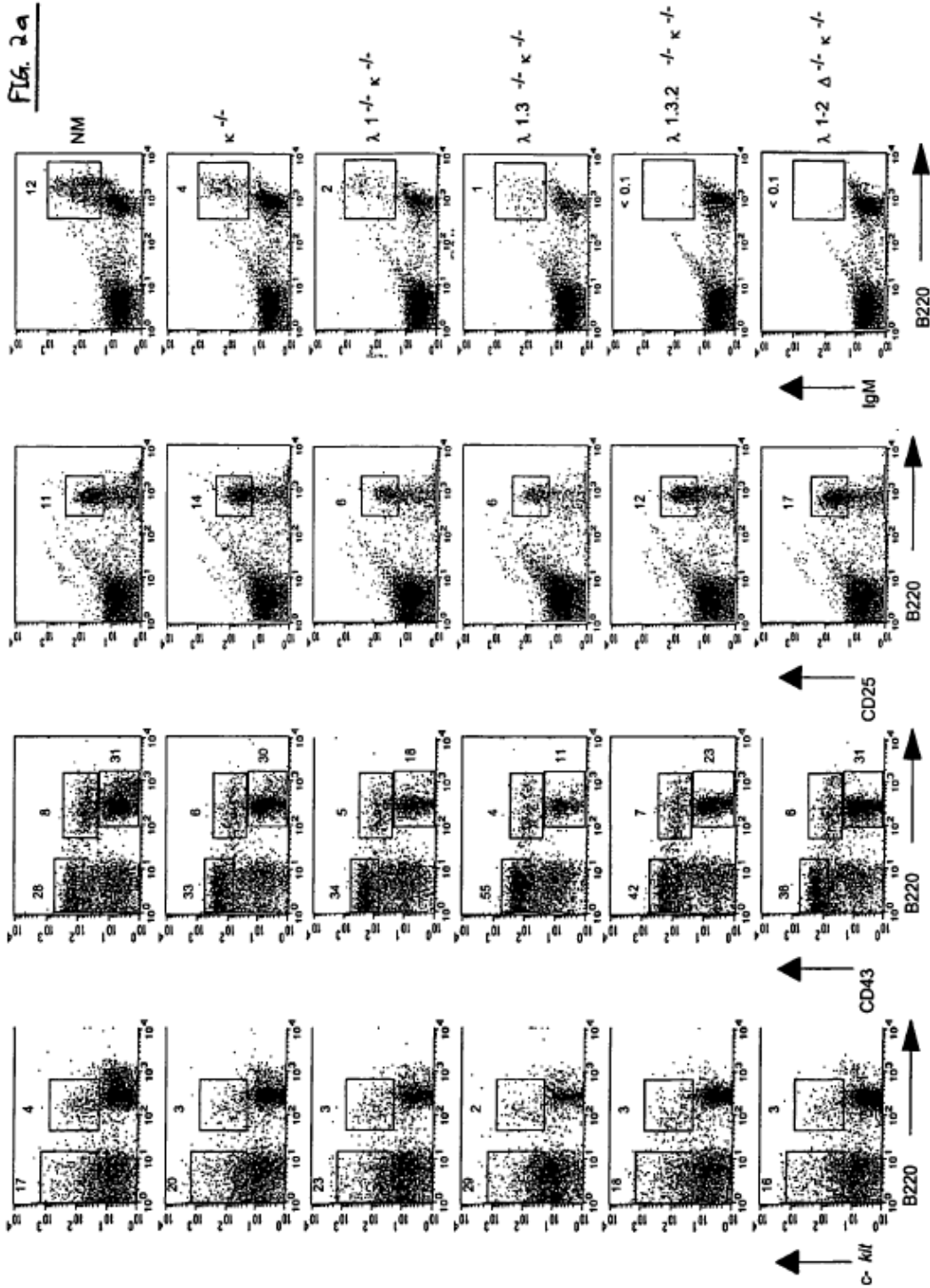
Órgano	NM	$\kappa^{-/-}$	$\lambda 1^{-/-}\kappa^{-/-}$	$\lambda 1.3^{-/-}\kappa^{-/-}$	$\lambda 1.3.2^{-/-}\kappa^{-/-}$	$\lambda 1-2\Delta^{-/-}\kappa^{-/-}$
Médula Ósea						
<b>N.º Células totales x 10<sup>6</sup>*</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
c- <i>kit</i> <sup>+</sup> , B220 <sup>+</sup> pro cel B	0,52	0,24	0,14	0,08	0,04	0,02
B220 <sup>+</sup> , CD43 <sup>+</sup> cel B pro/pre	0,95	0,51	0,29	0,16	0,08	0,04
B220 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> cel B inmad	1,32	1,26	0,36	0,21	0,14	0,10
B220 <sup>+</sup> , IgM <sup>+</sup> cél B inmad/mad.	1,34	0,33	0,10	0,05	0,01	0,10
B220 <sup>+</sup> Cel B	3,89	2,61	1,00	0,48	0,27	0,18
IgM <sup>+</sup> cél B						
Bazo						
<b>N.º Células totales x 10<sup>6</sup></b>	<b>38</b>	<b>42</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>24</b>
B220 <sup>+</sup>	10,40	7,42	3,62	4,31	0,67	0,39
IgM <sup>+</sup>	9,69	6,60	3,10	3,74	0,03	0,02
IgD <sup>+</sup>	7,81	3,10	1,18	1,51	<0,01	<0,01
IgL <sup>+</sup>						

Las células fueron teñidas con anticuerpos pertinentes para las características listadas (ver Materiales y Métodos) y analizadas. Los números de células totales fueron determinados por tinción con Tripán Blue \* Las células fueron provenientes de un fémur

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ratón en el cual el locus de la cadena ligera  $\lambda$  del ratón endógeno está funcionalmente silenciado, caracterizado por que el ratón tiene una delección de genes de la cadena ligera  $\lambda$  seleccionados de la siguiente parte de la región del locus  $\lambda$ :
- (a) C2 y C3-C1; o  
(b) C2-C1 (es decir C2-C4-C3-C1).
- 10 2. El ratón de acuerdo a la reivindicación 1 en el cual el locus de la cadena ligera  $\kappa$  está funcionalmente silenciado.
3. El ratón de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el locus de la cadena pesada de ratón es silenciado por un método de selección de genes (Knout-out).
- 15 4. El ratón de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual los loci de la cadena pesada,  $\lambda$  y  $\kappa$  han sido inactivados o silenciados.
5. El ratón de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que porta al menos un transgén el cual comprende uno o más genes pesados o loci y/o genes de cadenas ligeras o loci de una especie heteróloga.
- 20 6. El ratón de acuerdo a la reivindicación 5, en donde el ratón produce anticuerpos solamente de cadena pesada de la especie heteróloga.
7. El ratón de acuerdo a una de la reivindicación 5 o a de la reivindicación 6 donde la especie heteróloga es el ser humano.
- 25 8. Uso de un ratón como es definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para producir anticuerpos.
9. El uso de acuerdo a la reivindicación 8 donde los anticuerpos son producidos a través de procedimientos de inmunización.
- 30 10. El uso de acuerdo a la reivindicación 8 o a la reivindicación 9 donde los anticuerpos son humanos.
11. Un método para producir un ratón como se definió en la reivindicación 1 en el cual el locus de la cadena ligera  $\lambda$  está funcionalmente silenciado, comprendiendo el paso de delección de al menos los genes de las regiones constantes C1, C2 y C3 del locus de la cadena ligera  $\lambda$ .
- 35 12. El método de la reivindicación 11 donde los loci C2-C4 y los C3-C1 son delecionados simultánea o secuencialmente.
- 40





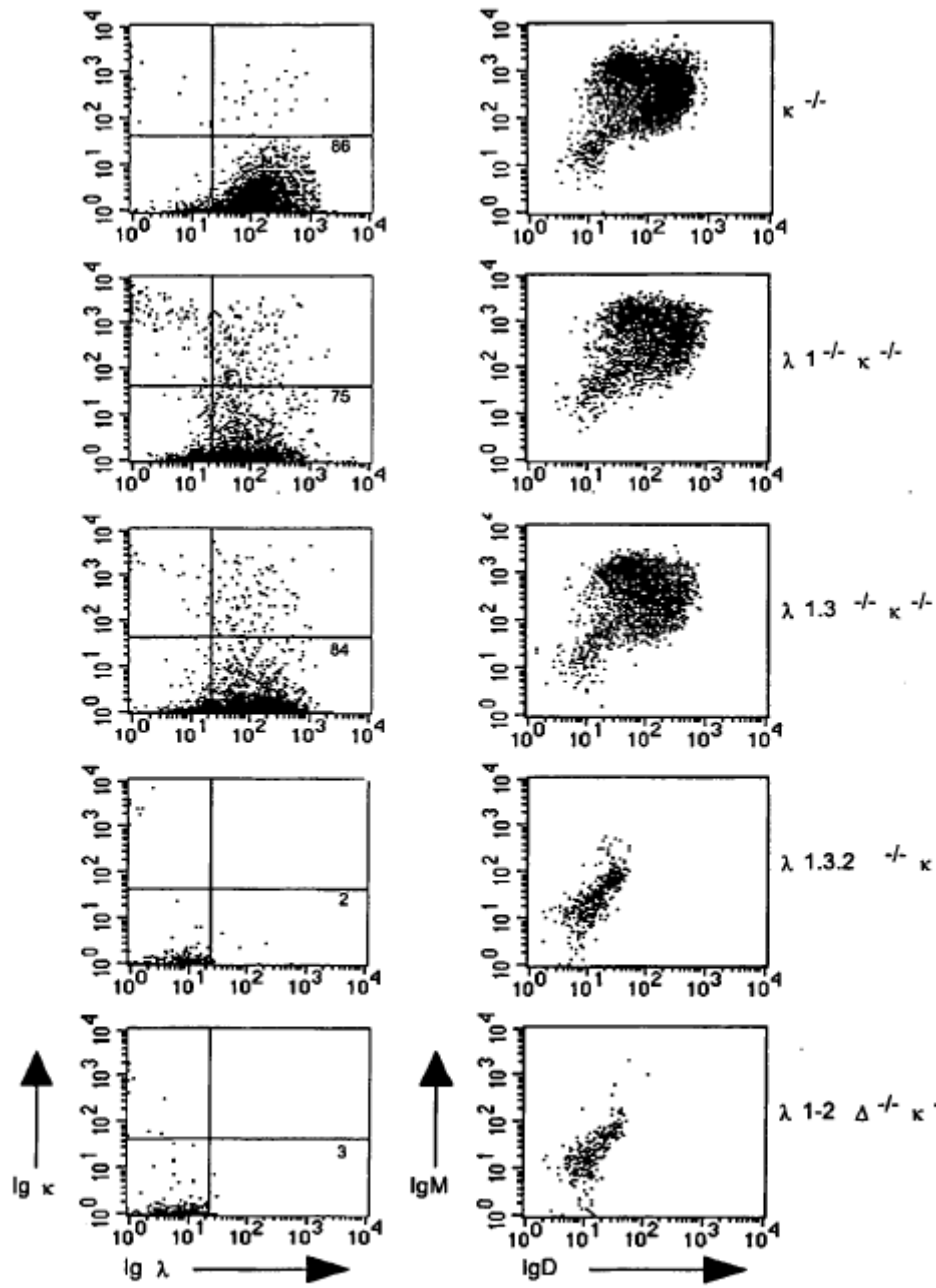


FIG. 2b

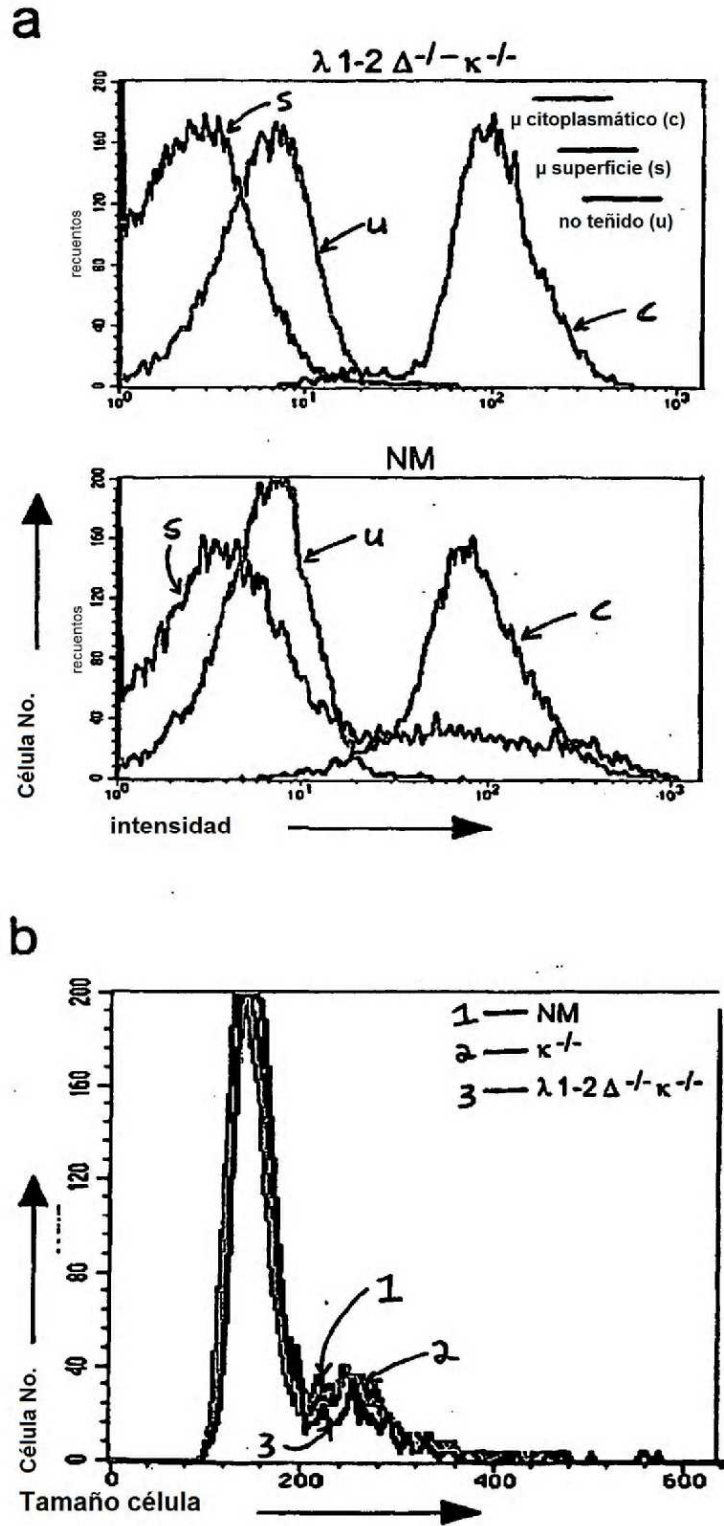


FIG. 3

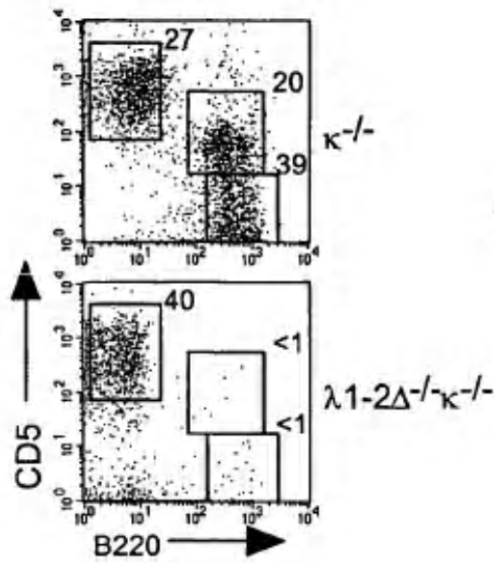


FIG. 4

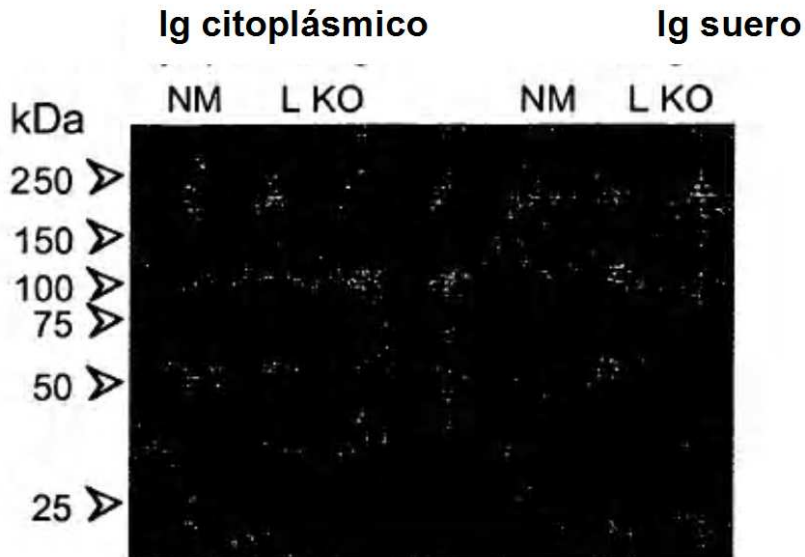


FIG. 5