



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 853**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02804929 .4**

86 Fecha de presentación : **17.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1463816**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54

Título: **Procedimiento para la inducción controlada de mutaciones somáticas y su aplicación en proteómica.**

30

Prioridad: **18.12.2001 FR 01 16352**
08.08.2002 FR 02 10078

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73

Titular/es: **Mixis France S.A.**
166 boulevard de Montparnasse
75014 Paris, FR

72

Inventor/es: **Reynaud, Claude-Agnès y**
Weill, Jean-Claude

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 292 853 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

Procedimiento para la inducción controlada de mutaciones somáticas y su aplicación en proteómica.

5 **Dominio de la invención**

La presente invención se refiere a la biología y, más especialmente, al dominio de la adaptación por mutación dirigida, específica del mundo viviente. Se refiere más especialmente a la inducción de mutaciones somáticas *in vitro* así como a las aplicaciones que los perfeccionamientos de una técnica así hacen posibles de ahora en adelante.

10 En una realización particular, la invención se refiere a la inducción de mutaciones sobre el linfoma de Burkitt BL2.

Compendio tecnológico de la invención

15 Para simplificar, se hace referencia en lo sucesivo al linfoma de Burkitt BL2. Sin embargo, hay que destacar que sólo pretende facilitar la exposición de la técnica referida y del concepto inventivo reivindicado, sin por eso limitar a este respecto la invención.

20 La estirpe celular del linfoma de Burkitt de tipo I BL2 presenta las características de los linfocitos B centroblásticos. Esta estirpe celular es la equivalente inmortalizada más cercana de los centroblastos de los centros germinativos. Se ha confirmado su origen de centro germinativo por la presencia de mutaciones somáticas en los genes V_H de la inmunoglobulina de los linfomas de Burkitt.

25 Se ha destacado la homogeneidad y la estabilidad de las células BL2 en los cultivos adecuados (Denépoux S. *et al.*, *Immunity*, vol. 6, 35-46, 1997). Se ha propuesto, conforme al fenotipo del centroblasto, considerar que BL2 es el resultado de la transformación de un centroblasto del centro germinativo que ha experimentado varias fases de mutaciones somáticas.

30 Por otro lado, se estima que los linfocitos B experimentan una hiperpermutación en la etapa de centroblasto [Pascual V. *et al.*, *J. Exp. Med.* 180, 329-339 (1994)].

El fenómeno de hipermutación de las inmunoglobulinas tiene lugar en los núcleos germinativos, después de la estimulación de un linfocito B por un antígeno dependiente de T.

35 En particular, Denépoux S. *et al.*, (obra citada anteriormente) han establecido que las células del linfoma, especialmente las células BL2, pueden poner en marcha un proceso de hipermutación después de la agregación de su receptor de superficie y del cocultivo con un linfocito T cooperador o amplificador, después de una semana de cultivo. Se ha concluido en este artículo que se puede aumentar la frecuencia de mutación mediante activaciones repetidas de las células BL2. Igualmente, estos autores han destacado que las mutaciones inducidas *in vitro* sobre BL2 no afectan la 40 región constante de la IgM y no hacen aparecer una selección dirigida por un antígeno.

Igualmente, Yélamos J. *et al.*, *Nature*, vol. 376, págs. 225-229 (1995) han relatado experimentos que tienden a demostrar que el fragmento del gen V de la inmunoglobulina no es indispensable para una hipermutación y que se podría simplificar la construcción de sustratos de mutación artificiales.

45 Luxembourg A.T. *et al.*, *Journal of Immunology*, vol. 153, n.º 10, 1994, págs. 4448-4457 describen la activación de las células sin tratamiento previo mediante CD21 o CD1, y el aumento del nivel de *c-fos*, que es un protooncógeno, mediante la coactivación por la IgM de superficie y el CD21.

50 A pesar de estos avances, hoy en día no se dispone de medios eficaces para estudiar estos fenómenos y para obtener resultados prácticos, en particular con fines de diagnóstico y/o de seguimiento, así como de tratamiento de los procesos tumorales, en unas condiciones de ejecución y de rapidez satisfactorias.

55 Por lo tanto, existía una necesidad de medios que permitan realizar ensayos de hipermutación somática rápidos y fiables. Más particularmente, existía una necesidad de medios que permitan disponer de un modelo de inducción de mutaciones somáticas, aplicable a los genes V, pero también a otros genes que puedan estar implicados en un proceso tumoral, especialmente en los humanos, como por ejemplo los genes Bcl-6 y el ligando Fas (FasL).

60 Ahora bien, se ha encontrado actualmente que las células del linfoma, especialmente los linfocitos BL2, pueden poner en marcha un procedimiento de hipermutación acelerada, en contra de lo que se describe en los datos de la técnica anterior, según los cuales era difícil y requería mucho tiempo poner en marcha un procedimiento comparable.

65 Más concretamente, se ha encontrado inesperadamente en la actualidad que, teniendo por modelo la célula BL2, se puede realizar *in vitro*, en unas condiciones de rapidez y de eficacia excepcionales, la inducción de mutaciones somáticas en las células adecuadas añadiendo a las células a hacer mutar, en las condiciones de cultivo y un medio adecuados para dichas células, al menos una combinación ternaria de los anticuerpos anti-CD19, anti-CD21 y anti-IgM.

La invención también tiene por primer objeto un procedimiento para la inducción de mutaciones somáticas *in vitro* o *ex vivo*, que contienen 1) la adición a las células a mutar, en condiciones de cultivo y en un medio adecuados para dichas células, de al menos una combinación ternaria de los anticuerpos anti-CD19, anti-CD21 y anti-IgM, mientras que 2) dichos anticuerpos anti-IgM se biotinilan y se someten a una agregación específica mediante la estreptavidina unida a un soporte, ventajosamente un soporte compuesto en su totalidad o en parte por perlas magnéticas.

Según una característica, la inducción de mutaciones somáticas según la invención se pone en marcha durante poco tiempo, en la práctica durante un tiempo del orden de 1 h 30 minutos (una hora y media).

Según una característica ventajosa, el procedimiento según la invención no comporta la realización de cocultivos con las células de otro tipo celular, especialmente con un linfocito T.

En efecto, se ha constatado que el procedimiento preconizado según la invención, en el que se efectúa una agregación específica de anticuerpos anti-IgM biotinilados por la estreptavidina unida a un soporte tal como, preferiblemente, perlas magnéticas así como una combinación de al menos tres anticuerpos anti-CD19, anti-CD21 y anti-IgM, procura *in vitro* una mutación rápida de las células cultivadas en presencia de estos anticuerpos, en un tiempo muy corto que no tiene comparación con las duraciones indicadas para la obtención de mutaciones *in vitro* según la técnica anterior.

Según una variante de realización, el procedimiento según la invención puede comprender una combinación de anticuerpos anti-IgM elegida entre una combinación de los anticuerpos anti-IgM y anti-CD19, una combinación de los anticuerpos anti-IgM y anti-CD21 y sus mezclas en todas las proporciones.

Según otra característica, el procedimiento según la invención se lleva a cabo mediante la inducción de mutaciones sobre el linfoma de Burkitt BL2.

Asimismo, la invención tiene por objeto la utilización de este procedimiento de inducción de mutaciones somáticas para la realización de ensayos *in vitro* de hipermutagenicidad a nivel proteico y/o génico.

Según una forma de realización, esta utilización se aplica a los linfomas B, en particular a los linfomas B humanos, más particularmente para la inducción de mutaciones sobre el linfoma de Burkitt BL2.

Según una forma de realización particularmente preferida, el sistema según la invención se utiliza para la inducción de mutaciones sobre el linfoma de Burkitt BL2 en la fase G0/G1.

Asimismo, la invención tiene por objeto un kit para la inducción de mutaciones somáticas, que se caracteriza porque comprende un sistema inductor de mutaciones somáticas como el definido más arriba.

Otro objeto de la invención es la utilización de este kit para la identificación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos del mutasoma, especialmente por el análisis de las proteínas.

En una realización, la utilización del kit según la invención comprende la identificación de modificaciones postraduccionales inducidas, en particular, mediante la identificación, aislamiento y análisis de un compuesto del mutasoma, especialmente de un compuesto proteínico, que aparece durante dicha inducción.

Según una característica de realización preferida, esta utilización comprende la provisión de, al menos, un gen, especialmente un gen que codifica una proteína de interés, sobre el cual se desea inducir mutaciones, mientras que se incluye dicho gen en un casete que contiene el promotor y el activador (*enhancer*) de los genes que codifican la cadena pesada o ligera de las IgG, y que con dicho gen se transfectan las células del linfoma, especialmente del linfoma de Burkitt BL2.

Según una forma de realización ventajosa, para hacer mutar una secuencia cualquiera, se encuadra la secuencia a mutar por el promotor y el activador de las IgG, preferiblemente, en un casete de mutación.

La invención se describe a continuación en referencia a un ejemplo de realización, que es puramente ilustrativo y que pretende procurar al experto en la técnica las indicaciones prácticas para la realización de la invención. Sobre la base de estas indicaciones y de sus conocimientos propios, el experto en la técnica es así apto para concebir, sin alejarse del alcance de la presente invención, los sistemas de ensayo conformes a la invención reivindicada.

Para la inducción de mutaciones somáticas *in vitro* sobre la célula BL2, se ha procedido del siguiente modo:

- Condiciones de cultivo de la célula BL2

Se han proporcionado células BL2 y se han mantenido en un medio completo a razón de 10^5 células por mililitro, durante 24 horas a 37°C y al 5% de CO₂.

El medio de cultivo era medio RPMI 1640, completado con FCS al 10%, así como 100 U/ml (unidades/ml) de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

ES 2 292 853 T3

- Estimulación

Se han lavado las células del medio RPMI, para retirar cualquier rastro de suero, mediante centrifugación a aproximadamente 1500 rpm durante 7 minutos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 10°C.

Se han recuperado las células BL2 en medio RPMI a razón de 10^6 células por 500 μ l.

En un frasco de 15 ml se han introducido 10^6 células en hielo y se han añadido:

- 20 μ l de anti-CD19 unido a FITC (proporcionado por Immunotech),
- 20 μ l de anti-CD21 unido a la PE (proporcionado por Becton Dickinson) y
- 4 μ l de anti-IgM unido a biotina (proporcionado por Immunotech).

Después de agitar hasta obtener una mezcla homogénea, se ha colocado ésta en hielo y se ha dejado ahí durante unos 20 minutos.

A continuación, se han lavado las células de esta mezcla en 10 ml de medio RPMI (a 4°C) y luego se ha centrifugado a 1500 rpm durante 7 min. Se han recuperado las células lavadas así en 500 μ l de RPMI en un tubo Eppendorf (1,5 ml) y se han añadido 20 μ l de perlas magnéticas, comercializadas bajo la denominación Dynal, que llevaban unida estreptavidina. Se ha dejado el tubo rotando sobre una rueda a unos 4°C durante 15 minutos.

Se han recuperado las células y las perlas a las que se habían fijado estas células en unos 4 μ l de medio completo más ADCM (procurado por el Centro de transfusión de Lyon, Francia) y, a continuación, se han distribuido las células tratadas así sobre una placa de titulación que contienen 24 pocillos por cultivo celular (a razón de unas 2×10^5 células por pocillo).

Se han dejado incubar las células durante aproximadamente 1 hora 30 minutos a 37°C. A continuación, se ha recuperado todo el contenido de un pocillo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se ha centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm.

Se ha recuperado el producto de la centrifugación para retirar el sobrenadante y sumergir el precipitado de centrifugación en nitrógeno líquido.

Se han comprobado las mutaciones del ADN mediante las técnicas moleculares clásicas, conocidas y practicadas de forma habitual por el experto en la técnica.

El análisis de los resultados obtenidos y de los de las investigaciones realizadas en paralelo sobre los distintos genes de V_H , y/o con células distintas a BL2, muestra que se pueden inducir así en la célula BL2 mutaciones *in vitro* sobre el gen V_H reorganizado por la estimulación de un grupo de receptores de superficie.

Como alternativa, se puede reemplazar la secuencia Ig, por ejemplo, por una secuencia procariota, tal como el gen de resistencia a la neomicina, y obtener mutaciones similares con BL2.

Así se ha podido establecer, según la invención, que:

- se pueden inducir mutaciones en aproximadamente 1 hora y 30 minutos después de la estimulación por el receptor de antígenos y en un grupo de correceptores, en ausencia de cocultivo con linfocitos T;
- como media, aproximadamente un tercio de las células experimentan el mecanismo de hipermutación;
- la mutación inducida según la invención tiene lugar en presencia de actinomicina D, que inhibe totalmente la transcripción;
- se inducen las mutaciones cuando se mantienen las células en la fase G0/G1 mediante hidroxiurea;
- asimismo, las mutaciones se inducen en aproximadamente 30 minutos cuando se preparan las células en la fase G0/G1 mediante separación por decantación.

Estos resultados se contradicen con las enseñanzas de la técnica anterior y demuestran que el procedimiento de hipermutación puede tener lugar en ausencia de transcripción y de cromátida hermana.

En la práctica, también se puede estudiar así en gel bidimensional la pérdida o la aparición de las proteínas, pero también su modificación postraduccional.

Por otro lado, las mutaciones somáticas realizadas así según la presente invención se han podido reinducir en las células adecuadas, tales como el linfoma de Burkitt BL2, mediante la estimulación de los receptores de la superficie. Una estimulación de este tipo se produce con toda probabilidad también *in vivo*.

5 El procedimiento y los medios según la invención permiten abordar en unas condiciones radicalmente más eficaces y seguras los estudios y los ensayos de determinación de los fenómenos de hiperpermutación de los genes, en particular de los genes de las inmunoglobulinas.

10 A continuación se resumen algunos avances y algunas aplicaciones que se pueden proponer debido a la realización de los medios según la invención. Está claro que esta enumeración no es limitante y que también se pueden contemplar otras aplicaciones.

15 A modo de ejemplo, es importante que se pueda determinar según la invención, en condiciones que no se podían realizar hasta ahora, cuáles son el papel y la importancia de la hipermutación somática en la transformación maligna de los linfocitos B en el centro germinativo.

20 La invención, que proporciona un modelo único de simplicidad y de rapidez para la inducción de mutaciones somáticas, ha permitido demostrar que el procedimiento de hipermutación puede tener lugar en ausencia de transcripción y de cromátida hermana.

También proporciona medios para la obtención del distintivo de la hipermutación a nivel proteico y génico, que tiene como objetivo permitir disponer de un ensayo simple, aplicable en particular a los linfomas B humanos.

25 Otras cuestiones sin resolver hasta la fecha son especialmente la del mecanismo molecular de la hipermutación y de la posible presencia de una polimerasa muy mutágena, así como la de los cofactores presentes.

30 En efecto, hay que recordar que no se conocen los cofactores, es decir, los componentes del mutasoma que permiten que el procedimiento de hipermutación actúe selectivamente sobre los genes V_H y V_L reorganizados en una etapa concreta de la respuesta inmunitaria. El sistema de ensayo según la invención proporciona los medios fiables y rápidos para seguir la cinética de tal procedimiento de hipermutación y para que el experto en la técnica, sobre la base de sus conocimientos propios e ilustrado por la presente descripción, pueda realizar ensayos rápidos y económicos especialmente aplicables a los linfomas B humanos.

35 Otro objeto más de la presente invención es un kit o conjunto de medios para la inducción de hipermutaciones y para la realización de ensayos relativos a ello, en el que el medio para la inducción de una hipermutación rápida comprende una combinación de anticuerpos como la descrita más arriba.

40 De forma más general, la presente invención proporciona los medios que permiten el estudio y el seguimiento de las primeras etapas moleculares de los procedimientos de mutación somática a nivel del ADN y de las proteínas.

45 Brevemente, también se puede, gracias a los medios llevados a cabo según la invención, modificar un gen mediante recombinación homóloga, o inactivarlo, por ejemplo en la célula BL2. La técnica según la invención, también realizable en las células, especialmente las células BL2, permite mejorar las propiedades mutadoras de estas células, pero también permite analizar la función que podría realizar tal molécula en la fisiología de los linfocitos B y de los linfomas de Burkitt.

50 Llevando a cabo los medios según la invención, se puede, por consiguiente, a modo de ejemplos no limitantes, obtener la sobreexpresión de algunos genes en BL2 y mejorar así la eficacia como célula mutante de ésta, mientras que la transfección de las moléculas que parecen estar implicadas en el procedimiento puede incluir, entre otros: AID, MSH2, MSH6 o las enzimas del tipo RAD30A y/o RAD30B.

Las mutaciones se inducen en la fase G1 del ciclo celular y se producen sobre una hebra del ADN del gen V_H reorganizado, que se fijan mediante replicación en una de las células hijas.

55 Por otro lado, los presentes inventores han podido establecer también el papel determinante de la pol iota, que es una ADN-polimerasa de la familia Y, en tal procesamiento de hipermutación somática (HMS) de los genes de las inmunoglobulinas.

60 Para producir los clones de BL2 deficientes en la pol iota (que es uno de los dos homólogos humanos de RAD30 de la levadura que presenta una actividad polimerasa muy propensa a errores para rellenar huecos cortos en el ADN), se ha utilizado un procedimiento de inactivación de los genes parecido al que se ha desarrollado para la inactivación del gen de AID (citidina-desaminasa inducida por la activación o en inglés, *Activation-induced cytidine deaminase*). La molécula de AID ha sido descrita, especialmente, por Muramatsu, M. *et al.*, "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme", *Cell* 102, 553-63 (2000); y Revy, P. *et al.*, "Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)", *Cell* 102, 565-75 (2000).

Se han generado dos clones pol $\text{iota}^{-/-}$ (54 y 267) a partir de un clon heterocigótico de pol iota . Se han utilizado las construcciones adecuadas para inactivar los dos alelos. Los dos clones $\text{iota}^{-/-}$ tenían la misma velocidad de proliferación que la estirpe celular de BL2 original, con un índice mitótico y un perfil de ciclo celular similares, y no presentaban aberraciones cromosómicas o translocaciones. No se ha detectado ninguna expresión de pol iota en los análisis de inmunotransferencia de los extractos celulares de los clones $\text{iota}^{-/-}$ 54 y 267 utilizando anticuerpos policlonales de conejo inducidos contra la pol iota humana. Se ha recuperado la expresión de la pol iota mediante la transfección de los vectores pIRES que dirigen la expresión del ADNc de la pol iota humana completa bajo el control del promotor de CMV: en los experimentos realizados, las tasas de expresión eran comparables con la observada en la estirpe de células BL2 normales, en los límites de las variaciones inherentes en las cuantificaciones mediante análisis de inmunotransferencia. Después de varios intentos, no ha sido posible obtener clones que sobreexpresan la pol iota , tanto en un contexto (*background*) normal como en un contexto carente de pol iota . Para el análisis posterior, se han seleccionado dos clones recuperados por cada célula diana.

Se pueden utilizar dos métodos diferentes para inducir en la estirpe celular BL2 una hipermutación de su gen V_H reorganizado. El primero hace intervenir una interconexión o reticulación del anti-IgM en cocultivo con un clon T cooperador, o una estirpe de linfocitos T cooperadores, en cuyo caso, las mutaciones, si se llegan a producir, se observan después de 3 días en cultivo [véase Denépoux, S. *et al.*, más arriba; y Poltoratsky, V. *et al.*, "Expression of error-prone polymerases in BL2 cells activated for Ig somatic hypermutation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7976-81 (2001)]. En los presentes ensayos, este sistema de inducción de HMS se ha adaptado mediante la utilización de la estirpe celular CB15, que es un linfocito T cooperador transformado mediante el virus del herpes Saimiri, en cocultivo, y una interconexión de IgM seguida de la agregación del anticuerpo anti-IgM biotinilado, por perlas de estreptavidina. El segundo método sólo hace intervenir la reticulación o una unión cruzada de los tres receptores de superficie, IgM, CD19 y CD21, o de una combinación de IgM y CD21 y/o IgM y CD19, seguida de la misma agregación del anticuerpo anti-IgM biotinilado, por perlas de estreptavidina, en cuyo caso se observaron mutaciones solamente después de 90 minutos de incubación. La frecuencia de mutación que surge de un solo ciclo de mutagénesis era parecida según los dos métodos, es decir, 4 a 6 x 10^{-4} por par de bases (véase la tabla 1 más adelante). La estirpe de células BL2 presenta también una frecuencia muy pequeña de mutación constitutiva de su gen V_H reorganizado, cuando se mantiene en cultivo, en la práctica, que no sobrepasa las 10^{-4} mutaciones por par de base después de 2 a 3 meses en cultivo.

No se ha observado ningún aumento detectable de la frecuencia de mutación cuando se han inducido mediante hipermutación los clones deficientes en pol iota 54 ó 267, tanto en el cultivo de linfocitos T como en el ensayo con los tres anticuerpos susodichos: sólo se han recuperado 7 mutaciones entre 298 secuencias V después de la estimulación frente a 5 entre 222 secuencias antes de la estimulación. Al contrario, la inducción de las mutaciones se ha recuperado mediante la reexpresión del ADNc de la pol iota en estos clones, a unos niveles comparables a los que presentaba la BL2 normal: 83 mutaciones en 547 secuencias V después de la estimulación frente a 6 en 547 secuencias V antes de la estimulación. Además, el esquema de reversión de la mutación en estos clones que expresan la pol iota era similar al esquema de mutación de BL2, con una acción específica sobre los pares de bases GC y una propensión a las transiciones (véase la tabla 2). Como para la BL2 normal, el gen $C\mu$ de los clones con la pol iota restaurada no parece sufrir mutaciones selectivas después de la inducción.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 292 853 T3

TABLA 1

Frecuencias de mutación del gen V en los subclones de BL2 deficientes en pol iota y competente para pol iota			
Tipo de célula	No estimulada	Estimulada	
		Anti-IgM/CD19/CD21	Anti-IgM/CB15
BL2	$0,71 \times 10^{-4}$ (7 / 236)	$3,7 \times 10^{-4}$ (29 / 187)	$3,8 \times 10^{-4}$ (26 / 165)
Clones pol iota ^{-/-}			
54	$0,82 \times 10^{-4}$ (3 / 88)	$0,96 \times 10^{-4}$ (4 / 100)	$0,51 \times 10^{-4}$ (2 / 95)
267	$0,36 \times 10^{-4}$ (2 / 134)	$1,00 \times 10^{-4}$ (1 / 24)	$<0,30 \times 10^{-4}$ (0 / 79)
Clones pol iota ^{-/-} restaurados con ADNc de pol iota			
54-7	$0,31 \times 10^{-4}$ (1 / 78)	$2,9 \times 10^{-4}$ (14 / 115)	$3,1 \times 10^{-4}$ (9 / 69)
54-10	$0,43 \times 10^{-4}$ (2 / 111)	$2,4 \times 10^{-4}$ (8 / 79)	n.d.
267-20	$0,27 \times 10^{-4}$ (1 / 89)	$4,0 \times 10^{-4}$ (19 / 113)	$5,1 \times 10^{-4}$ (22 / 104)
267-12	$0,50 \times 10^{-4}$ (2 / 97)	$4,0 \times 10^{-4}$ (11 / 67)	n.d.
Nota: las frecuencias de las mutaciones se expresen en mutación por nucleótido, indicándose el número total de mutaciones por gen V secuenciado (416 pb) entre paréntesis.			

TABLA 2

Porcentaje de sustitución de nucleótidos en las mutaciones generadas en el gen V4-39-JH5 de la estirpe celular pol iota ⁺ de BL2 restaurado para la expresión de pol iota ^a					
A:	A	T	G	C	Total
De:					
A		3,6 (0,9)	7,2 (4,6)	1,8 (1,4)	24,9 (20,5)
T	4,6 (3,1)		0 (2,7)	7,7 (7,8)	
G	28,1 (26,3)	13,5 (4,8)		1,3 (7,5)	75,1 (79,5)
C	9,6 (10,6)	19,0 (24,2)	3,6 (6,1)		
Transiciones:	62,0 (62,9)		Transversiones:	38,0	(37,1)
Nota: se han analizado 74 sustituciones de bases sobre los 416 pb de la secuencia VDJ, sobre un total de 83 mutaciones que comprenden 9 inserciones (indicadas en la tabla 1). El porcentaje de sustitución se corrige de la composición de bases del segmento V. Los números en negrita se refieren a las mutaciones inducidas en los clones con la pol iota restaurada, mientras que los valores relativos a la inducción de BL2 normal están entre paréntesis.					

Otro objeto de la invención es la utilización de la ADN-polimerasa iota para el ajuste de la hipermutagenicidad en los ensayos *in vitro* de la hipermutagenicidad a nivel proteico y/o génico, en particular sobre los linfomas B, especialmente el linfoma de Burkitt BL2.

Otro objeto más de la invención es la utilización de una ADN polimerasa iota mejorada, especialmente restaurada después de cambiar, al menos, uno de sus aminoácidos naturales, según las técnicas que conoce el experto en la técnica, para aumentar la hipermutagenicidad en tales ensayos. Según la invención, esta mejora de la pol iota se efectúa ventajosamente mediante mutagénesis al azar del dominio II anular ("Ring Finger") para reemplazarle, al menos, un aminoácido y, luego, restaurar las funciones de la enzima.

La invención tiene como otro objeto un kit para inducir mutaciones somáticas como las descritas más arriba, que contienen además los medios para inactivar el gen pol iota y/o para restaurarlo mediante la expresión del ADNc de la pol iota.

La identificación de esta contribución de pol iota se ilustra con más detalle, a continuación, en la parte experimental.

Inducción de la hipermutación del gen V en la estirpe de células BL2

Se ha inducido una hipermutación del gen V según dos modos operativos diferentes. Con el primer modo operativo, se han efectuado interconexiones de los receptores de superficie IgM, CD19 y CD21 conforme al protocolo descrito más arriba. El segundo modo de activación se basaba en un cocultivo con la estirpe celular CB15, que es una estirpe de linfocitos T cooperadores transformados mediante el virus del herpes Saimiri. Se ha cultivado la CB15 en el medio RPMI 1640 (Invitrogen), complementado con 10% de suero bovino fetal (Hyclone), penicilina/estreptomina (Invitrogen) y 50 unidades/ml de IL2 (Sigma). Se ha irradiado la CB15 a 4000 rads, se ha resuspendido en un medio completo más el 2% de Caryoser (CTS, Lyon) y se ha depositado a razón de 500.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos o alvéolos que se habían recubierto durante una noche con anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag, 2,5 µg/pocillo). Se han incubado 2 x 10⁶ células BL2 en 0,5 ml de RPMI durante 20 minutos sobre hielo con un anticuerpo anti-IgM biotinilado (0,6 mg/ml, Caltag Laboratories) y, luego, se ha reticulado con perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina

ES 2 292 853 T3

(Dynabeads M280, Dynal), durante 20 minutos, sobre una bandeja giratoria y a temperatura baja. Se ha resuspendido la BL2 a razón de 100.000 células/ml en medio RPMI completado con el 2% de Caryoser, y se han depositado 0,5 ml por pocillo de una placa de 24 pocillos que contiene CB15 irradiada y anti-CD3 (en una proporción BL2:CB15 de 1:10). Se han recogido las células después de 3 días de incubación a 37°C, se ha extraído el ADN por medio de un kit adecuado, denominado kit de tejidos DNeasy (Qiagen), y se han analizado las mutaciones después de la amplificación del gen V4-39-JH5. Se han identificado las mutaciones mediante alineamientos múltiples de electroferogramas y la utilización de la aplicación AutoAssembler (Applera).

Inactivación del gen pol iota en BL2

La secuencia genómica de la pol iota humana se ha recogido a partir del clon HTGS de 180 kb AC021325, que contiene todos los exones codificantes. Los fragmentos de ADN utilizados para generar las construcciones de acción selectiva se han amplificado a partir del ADN genómico de BL2 y se han clonado primero con el kit de clonación para PCR TOPO-XL (Invitrogen), se han escindido por medio de *Sall* y de *XhoI* si sus sitios estaban añadidos a los cebadores de PCR, o bajo la forma de fragmentos *MluI*-*NotI* si los sitios de restricción no se habían perdido, y se han clonado en los sitios correspondientes de un vector pBSK (Stratagene) al que se habían añadido los sitios *SfiI* y *MluI* en el sitio *SacI* de su policonector. Los genes de resistencia a la neomicina o a la higromicina se han insertado entre los fragmentos que enmarcan 5' y 3'. Se han utilizado los cebadores de PCR siguientes para la amplificación:

Primer alelo:

fragmento 5', 5'-iota1-5', **CACTCGAGTACCAGCCGTCTGGTGTTTG**,
y 5'-iota1-3', **CAGTCGACTACAGTCTCCAGTCGCTC** (3,1 kb);
fragmento 3', 3'-iota1-5', **CACTCGAGCTCAAATCCAGAGCTAAAAG**,
y 3'-iota1-3', **CAGTCGACATAGTTGCAGGTAACCACC** (2,5 kb).

Segundo alelo:

fragmento 5', 5'-iota2-5', **CACTCGAGAGAGCGACTGGAGACTGTAG**,
y 5'-iota2-3', **ACGTCGACAGGAAGAATGCAGAGTGACG** (1,8 kb);
fragmento 3', 3'-iota2-5', **CTCAGTCGACGGTGGTTACCTGCAACTATG**,
y 3'-iota2-3', **CCAAGTCTCTCAACAACCTGG** (3,8 kb).

Se han utilizado las polimerasas *Pfu* turbo (Stratagene) para la amplificación del fragmento 5' de la primera construcción y Herculanase (Stratagene) para el fragmento 3' de la segunda construcción (30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 12 min a 68°C durante 40 ciclos), el sistema de PCR Expand Long Template PCR System (Roche) para el fragmento 3' de la primera construcción (40 ciclos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que comprenden un incremento en el tiempo de elongación), y el kit de PCR Advantage 2 PCR Kit (Clontech) para el fragmento 5' de la segunda construcción (30 s a 94°C, 30 s a 64°C y 4 min a 68°C). Se ha efectuado la transfección de 30 µg de construcciones finalizadas por *NotI* o *MluI* tal y como se describe en Bertocci, B. *et al.*, *Immunity* 9, 257-65 (1998). El cribado de los clones diana del gen se ha efectuado mediante PCR sobre lotes de 10 clones con los cebadores siguientes situados en el exterior de la construcción y en el interior del gen de resistencia a la neomicina o a la higromicina:

Primer alelo, iota-5'-test, **ATGACCCAAGCTCAAGACAGC**
y neo^R **CATAGCGTTGGCTACCCGTG** en 5',
y 3'-iota2-3' y neo^R inverso, **CACGGGTAGCCAACGCTATG** en 3';

Segundo alelo, iota-5'-test

e higo^R, **GCTGTGTAGAAGTACTCGCC**
(Sistema Expand Long Template PCR, Roche).

ES 2 292 853 T3

Para el primer alelo, se ha obtenido la recombinación homóloga en un clon entre 518 transfectantes.

Para el segundo alelo, 2 clones entre 535 estaban modificados selectivamente de forma correcta.

- 5 Se ha atribuido esta poca frecuencia a la utilización de enzimas de PCR con una fidelidad mediocre para construir los vectores de acción selectiva. Se ha observado tal actividad de polimorfismo específica de una cepa sobre la recombinación homóloga en las células ES murinas, donde se ha comprobado que una diferencia de secuencia del 0,6% ha dado lugar a una división por 50 de la eficacia de la acción selectiva. También las otras inactivaciones de genes efectuadas después sobre BL2 con las construcciones amplificadas solamente con la ADN-polimerasa *Pfu* turbo
10 (Stratagene), que es una enzima cuya frecuencia de error es inferior a 10^{-4} por par de bases en las condiciones de amplificación utilizadas, han dado una frecuencia de acción selectiva en el intervalo del 1% al 2%.

Transfección de clones BL2 deficientes en pol iota

- 15 Los clones deficientes en pol iota se han transfectado con los vectores de expresión de pol iota y se han construido mediante amplificación de un ADNc de pol iota humano de longitud completa [McDonald, J. P. *et al.*, *Genomics* 60, 20-30 (1999)] con los cebadores siguientes:

20 5'-iota, GCGGATCCACGACGAGGAAGACG | y
3'-iota, GCGGATCCTACGCTTTGTGCCAG

- 25 (se ha subrayado el sitio de *Bam*HI), en el sitio *Bam*HI del vector pIRES puro (Invitrogen). La transfección y la selección de los clones se ha efectuado según las técnicas clásicas, que conoce el experto en la técnica, tal y como se describe más arriba.

Análisis de los clones de BL2 mediante RT-PCR y análisis de inmunotransferencia

- 30 Los análisis de inmunotransferencia se han realizado de la manera tradicional con los anticuerpos policlonales contra pol iota (péptido KLH-conjugado 15-mero, en el extremo carboxilo).

- 35 Además, se ha comprobado que se puede mejorar aún más la pol iota según las técnicas que conoce el experto en la técnica (véase especialmente la técnica de Prakash), puestas a punto para la enzima pol eta, que posee como pol iota un dominio II anular ("Ring Finger") en el cual se puede hacer mutar, mediante una mutagénesis al azar de dicho dominio II, al menos un aminoácido presente en este dominio "Ring Finger", que tiene por resultado un aumento significativo de la actividad de la enzima mutada de esta manera.

- 40 La invención también tiene por objeto un kit para la inducción de mutaciones somáticas como las descritas más arriba, que contienen una enzima pol iota mejorada así mediante mutagénesis al azar de su dominio II anular para cambiarle, al menos, un aminoácido que tiene por resultado mejorar el funcionamiento y, luego, la restauración de la enzima mediante medios tales como los indicados más arriba.

- 45 Este sistema, en sus diversas variantes de realización expuestas más arriba, permite también especialmente identificar las mutaciones necesarias para mejorar las funciones de una proteína de interés. Por ejemplo, en el caso ilustrativo y no limitante del gen que codifica la insulina, colocado en un casete promotor-activador transfectado en BL2, puede producir numerosas moléculas, entre las cuales la que funcione mejor se fijará preferiblemente sobre su sustrato. Procediendo a continuación a la secuenciación del gen mutado que codifica esta proteína preferente y a la identificación,
50 por los medios conocidos, de los aminoácidos modificados que han permitido esta mejora del funcionamiento, las mutaciones que permiten obtener una insulina más eficaz se pueden identificar muy rápidamente mediante el procedimiento según la invención.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inducción de mutaciones somáticas *in vitro*, **caracterizado** porque comprende 1) añadir a las células a hacer mutar, en las condiciones de cultivo y en un medio adecuados para dichas células, al menos una combinación de anticuerpos que comprende los anticuerpos anti-IgM elegida entre una combinación de anticuerpos anti-IgM y anti-CD19, una combinación de anticuerpos anti-IgM y anti-CD21 y una combinación de anticuerpos anti-IgM, anti-CD19 y anti-CD21, mientras que 2) dichos anticuerpos anti-IgM se biotinilan y se someten a una agregación específica gracias a la estreptavidina unida a un soporte.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho soporte se compone en su totalidad o en parte de perlas magnéticas.

3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque se utiliza el linfoma de Burkitt BL2 para las células a hacer mutar.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque comprende además la etapa que consiste en hacer variar la tasa de la ADN-polimerasa iota.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se recupera la ADN-polimerasa iota previamente inactivada, mediante transfección de los vectores pIRES que conducen a la expresión del ADNc de la pol iota completa bajo el control del promotor de CMV.

6. Utilización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la realización de ensayos *in vitro* de hipermutagenicidad a nivel proteico y/o génico.

7. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque se aplica a los linfomas B, en particular a los linfomas B humanos.

8. Utilización según la reivindicación 7, **caracterizada** porque se destina a la inducción de mutaciones en el linfoma de Burkitt BL2.

9. Utilización según la reivindicación 8, **caracterizada** porque se pretende la inducción de mutaciones sobre el linfoma de Burkitt BL2 en la fase G0/G1.

10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizada** porque comprende además la utilización de la ADN-polimerasa iota para ajustar la hipermutagenicidad en los ensayos *in vitro* de la hipermutagenicidad a nivel proteico y/o génico, en particular en los linfomas B, especialmente el linfoma de Burkitt BL2.

11. Utilización según la reivindicación 10, **caracterizada** porque se pone en funcionamiento una ADN-polimerasa iota con el reemplazo de al menos un aminoácido en el dominio II *Ring finger*.

12. Utilización de un kit que contiene los medios para la inducción de mutaciones somáticas que comprenden, al menos, una combinación de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-IgM elegida entre una combinación de anticuerpos anti-IgM y anti-CD19, una combinación de anticuerpos anti-IgM y anti-CD21 y una combinación de anticuerpos anti-IgM, anti-CD19 y anti-CD21, para la inducción de mutaciones somáticas, *in vitro*.

13. Kit para utilización según la reivindicación 12, **caracterizado** porque dichos anticuerpos anti-IgM están biotinilados y se han sometido a una agregación específica gracias a la estreptavidina unida a un soporte, especialmente a perlas magnéticas, mientras que el kit comprende una combinación ternaria de los anticuerpos anti-IgM, anti-CD19 y anti-CD21.

14. Kit para la utilización según una de las reivindicaciones 12 ó 13, **caracterizado** porque comprende además los medios para la inactivación del gen de la pol iota y/o para la restauración de éste mediante la expresión del ADNc de la pol iota.

15. Kit según la reivindicación 14, **caracterizado** porque comprende una ADN-polimerasa iota con el reemplazo de al menos un aminoácido en el dominio II *Ring finger*.

16. Utilización según la reivindicación 12, para la identificación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos del mutasoma, especialmente para el análisis de las proteínas.

17. Utilización según la reivindicación 16, **caracterizada** porque comprende la identificación, las modificaciones postraduccionales inducidas, en particular mediante la identificación, aislamiento y análisis de un compuesto del mutasoma, especialmente de un compuesto proteínico, que aparece durante dicha inducción.

18. Utilización según la reivindicación 16, **caracterizada** porque comprende la provisión de al menos un gen, especialmente un gen que codifica una proteína de interés, sobre el cual se desea inducir mutaciones, mientras que

ES 2 292 853 T3

dicho gen está incluido en un casete que contiene el promotor y el activador (*enhancer*) de los genes que codifican la cadena pesada o ligera de las IgG, y que con dicho gen se transfectan células de linfoma, especialmente del linfoma de Burkitt BL2.

5 19. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizada** por hacer mutar una secuencia cualquiera, encuadrándose la secuencia a hacer mutar por el promotor y el activador de las Ig, preferiblemente en un casete de mutación.

10 20. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizada** porque, para hacer mutar una secuencia cualquiera, se introduce esta secuencia mediante recombinación homóloga en el locus de las inmunoglobulinas, reemplazando todo o parte del gen V de uno de los dos loci reorganizados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65