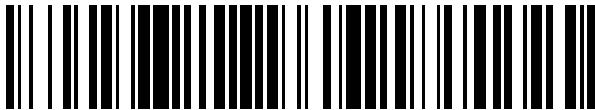


OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 351 646**

(21) Número de solicitud: 200930251

(51) Int. Cl.:
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **02.06.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

(73) Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)** (Titular al 92,5%)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (Titular al 7,5%)

(72) Inventor/es:

DELGADO CAÑAVERAS, PILAR;
GARCÍA BUSTELO, XOSÉ RAMÓN;
MARTÍNEZ MARTÍN, NURIA;
CALLEJA SIERRA, ENRIQUE;
CUBELOS ÁLVAREZ, BEATRIZ y
ALARCÓN SÁNCHEZ, BALBINO JOSÉ

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **MAMÍFERO NO HUMANO MODIFICADO GENÉTICAMENTE, CÉLULAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLAS.**

(57) Resumen:

Mamífero no humano modificado genéticamente, células y métodos para producirlas. La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la biotecnología, y se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente cuyas células comprenden una secuencia nucleotídica inactivada funcionalmente o que ha sido suprimida total o parcialmente, donde dicha secuencia corresponde a un gen que codifica para la proteína TC21 (RRas2 o R-Ras2). Asimismo, la invención también se refiere a una célula aislada, procedente de un mamífero, modificada genéticamente para que presente la modificación genética descrita, así como a los métodos para producir tanto los animales como las células modificadas genéticamente y al uso de dichas células y métodos que las comprenden para el cribado y selección de compuestos con capacidad moduladora de la supervivencia y homeostasis de las células B y T. Por otra parte, la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA para la silenciación post-transcripcional del producto de expresión de la citada proteína TC21.

DESCRIPCIÓN

Mamífero no humano modificado genéticamente, células y métodos para producirlas.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la biotecnología, y se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente cuyas células comprenden una secuencia nucleotídica inactivada funcionalmente o que ha sido suprimida total o parcialmente, donde dicha secuencia corresponde a un gen que codifica para la proteína TC21 (RRas2 o R-Ras2). Asimismo, la invención también se refiere a una célula aislada, procedente de un mamífero, modificada genéticamente para que presente la modificación genética descrita, así como a los métodos 10 para producir tanto los animales como las células modificadas genéticamente y al uso de dichas células y métodos que las comprenden para el cribado y selección de compuestos con capacidad moduladora de la supervivencia y homeostasis de las células B y T. Por otra parte, la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA para la silenciación post-transcripcional del producto de expresión de la citada proteína TC21.

15 **Estado de la técnica anterior**

En ausencia de antígenos, el número de linfocitos periféricos T y B es constante gracias a mecanismos homeostáticos estrictos, que evitan su proliferación descontrolada y por tanto el desarrollo de linfomas (Seddon y Zamoyska. 2003. *Curr Opin Immunol*, 15: 321-324). Estos mecanismos garantizan también la disponibilidad de poblaciones de 20 células clónicas, cuya proliferación específica en respuesta a patógenos se regula mediante señales transmitidas por interleuquinas y por factores de crecimiento, señales que difieren para las células T y B, y para los linfocitos "vírgenes" ("naïve") respecto a los linfocitos de memoria.

25 En el control de la proliferación de las células T y B, tanto en homeostasis como en respuesta a antígeno, tienen gran relevancia sus respectivos receptores de antígeno (TCR y BCR). En las células T $\alpha\beta$, TCR está compuesto por las subunidades de unión a ligando TCR α y TCR β y por las subunidades de señalización CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ . El TCR estimula el paso de la fase G0 a G1 del ciclo celular de los linfocitos T, quienes, bajo el estímulo de las citoquinas producidas en respuesta a la unión de antígeno (principalmente la IL-2) progresan en dicho ciclo, resultando en una expansión clonal de los linfocitos que responden a un antígeno dado. Por otra parte, en ausencia del 30 TCR, la supervivencia de los linfocitos T maduros es muy limitada, probablemente porque necesitan de las señales de baja intensidad que este receptor produce constantemente en respuesta a la unión del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) a péptidos no antigenicos. De manera similar, la ausencia del receptor de antígenos de las células B (BCR) limita mucho la supervivencia de las células B maduras (Lam *et al.* 1997. *Cell*, 90: 1073-1083).

35 Aunque sigue sin estar claro cómo TCR y BCR transducen las señales de supervivencia y homeostáticas, un mediador importante en esta transducción es la fosfoinositidil-3-quinasa (PI3K), cuya activación está directamente ligada a la recepción del antígeno por los receptores TCR y BCR. Consecuentemente, la inactivación de la subunidad p110 δ reduce significativamente el número de células B y T periféricas (Okkenhaug *et al.* 2007. *Trends Immuno*, 28: 80-87). Esta subunidad es activada selectivamente por las proteínas R-Ras y R-Ras2 (también denominada TC21), que 40 pertenecen a la familia de proteínas Ras. Las proteínas Ras son moléculas que regulan el ciclo celular por medio de las conformaciones de su unión a GTP (forma activa) y su unión a GDP (forma inactiva).

45 En línea con el papel clave de TC21 en la regulación de la proliferación de las células, se ha encontrado que el cáncer de ovario y el leiomiosarcoma presentan ciertas mutaciones que resultan en la activación de TC21. También se ha comprobado que su sobre-expresión está ligada a tumores de mama, esófago y estómago (Chan *et al.* 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7558-7562; Huang *et al.* 1995. *Oncogene*, 11: 1255-1260; Clark *et al.* 1996. *Oncogene*, 12: 169-176).

50 En linfocitos no se conocen las vías de transmisión de señales en las que interviene TC21. Por tanto, sería importante el uso de determinadas células procedentes de un organismo modificado genéticamente o células modificadas directamente, para facilitar la selección de compuestos capaces de modular la homeostasis de las células B y T y, como consecuencia, para el tratamiento de enfermedades cancerosas relacionadas con dichos linfocitos B y T.

Explicación de la invención

55 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la biotecnología, y se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente cuyas células comprenden una secuencia nucleotídica inactivada funcionalmente o deletcionada (que ha sido suprimida) total o parcialmente donde dicha secuencia corresponde a un gen que codifica para la proteína TC21 (RRas2 o R-Ras2). Asimismo, la invención también se refiere a una célula aislada, procedente de un mamífero, modificada genéticamente que presenta la modificación genética descrita así como a los métodos para producir tanto los animales como las células modificadas genéticamente y al uso de dichas células y métodos que las comprenden para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la supervivencia y homeostasis de las células B y T. Por otra parte la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA para la silenciación post-transcripcional del producto de expresión de la citada proteína TC21.

65 Los receptores de los antígenos celulares T y B (TCR y BCR) transmiten señales de baja intensidad necesarias para la supervivencia y el mantenimiento de las poblaciones de células maduras. Los autores demuestran aquí que el TC21, una GTPasa de pequeño tamaño, interactúa constitutivamente con los TCR y BCR a través de los motivos

de activación basados en tirosina asociados a inmunoreceptores (ITAM) que se encuentran en sus subunidades CD3. La expresión tanto de un mutante TC21 dominante-negativo o de una construcción shRNA en células T provoca una rápida disminución de la viabilidad celular. De forma más importante, los ratones TC21-/ tienen pocas células T y B maduras, posiblemente como resultado de una proliferación homeostática deficiente y una supervivencia defectuosa. Los autores demuestran que TC21 se sobreexpresa en varios cánceres linfáticos y que se asocia con un ITAM vírico, sugiriendo que la desregulación de la actividad de TC21 o de su distribución contribuye a la formación de linfomas.

La transfección de células T tanto con un mutante TC21 dominante negativo o con una construcción shRNA lleva a una pérdida rápida de viabilidad celular, indicando que TC21 tiene un papel no redundante en la supervivencia de la célula T. Además, cuando el gen TC21 se ha inactivado en ratones, se detectan pocas células B y T periféricas, aunque éstas se desarrollan con normalidad. Los ganglios linfáticos de los ratones deficientes en TC21 aparecen minorados en los centros germinales, y las células B de zona marginal (ZM) están virtualmente ausentes. Estos resultados sugieren que TC21 se une directamente a TCR y BCR en los que cumple un papel esencial en la supervivencia mediada por el receptor antigénico y en la señalización homeostática. Además, la asociación directa de TC21 con los ITAM víricos y no víricos (por ejemplo, los de TCR y BCR) no fosforilados sugiere un papel para TC21 en la señalización de baja intensidad del receptor antigénico, así como en la transformación de los linfocitos.

Un aspecto de la presente invención es una célula aislada procedente de un mamífero modificada genéticamente, que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, en homocigosis o heterocigosis.

La secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 puede ser, pero sin limitarse, una secuencia de ADN genómico, secuencia que contiene exones e intrones.

La secuencia SEQ ID NO: 1 es la secuencia codificante (ADNc; secuencia que contiene sólo los exones) del gen *RRas2* de *Mus musculus* (ratón). Tras el procesado (*splicing*) del ARN mensajero (ARNm) transrito en la célula a partir de la citada secuencia de ADN genómico o a partir de la secuencia de ADNc SEQ ID NO: 1, se da lugar a una proteína idéntica partiendo de cualquiera de las dos secuencias. Las proteínas, producto de la expresión de la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, tienen una identidad superior al 80% y tienen la misma función. Es decir, las secuencias con, al menos, un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 son secuencias homólogas del gen *RRas2* de mamíferos.

Las secuencias homólogas se refieren a secuencias de especies distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra. En esta realización preferida de la presente invención se consideran todas las secuencias homólogas, tanto ortólogas como parálogas, que tienen, al menos, un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1. Esta secuencia homóloga cubre las secuencias que codifican para una secuencia homóloga de SEQ ID NO: 1 en ratón y en cualquier otro mamífero.

La célula modificada genéticamente contiene un producto de la expresión de la secuencia con al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 no funcional. Preferiblemente, el producto de la expresión es una proteína no funcional como consecuencia de la inactivación funcional o delección total o parcial de su secuencia (el término “disrupción” puede usarse también para referirse a “delección”). La célula contiene dicha modificación genética en homocigosis (-/- o *TC21*^{-/-}) o en heterocigosis (+/- o *TC21*^{+/−}). En homocigosis, la modificación genética está presente en las dos copias del genoma, lo que asegura la transferencia de la misma a las células descendientes si éste es el ADN nuclear. En heterocigosis, la modificación genética está presente en una sola copia del genoma (gen ID 66922, cromosoma 7, anotación NC_000073.5 en ratón; gen ID 22800, cromosoma 11p15.2 anotación NC_000011.8 en humanos). En cualquier caso, la célula modificada de la presente invención contiene dicha modificación genética en su ADN genómico. Asimismo, la célula modificada genéticamente puede conseguirse por cruzamiento o por transformación de plastidios de la célula huésped. Las células modificadas genéticamente pueden tener dicha modificación genética en uno o más tipos de material genético de la célula; cloroplástico, mitocondrial o nuclear.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la célula modificada genéticamente aislada de un mamífero, donde la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, es la propia secuencia de ADNc SEQ ID NO: 1.

Otra realización preferida se refiere a la célula modificada genéticamente donde dicha célula es somática o germinal.

El término “células somáticas” tal como se entiende en la presente invención, se refiere a las células que integran los tejidos u órganos de un mamífero. El término “células germinales” tal como se entiende en la presente invención, se refiere a las células que forman los gametos de un mamífero. La célula germinal se selecciona, pero sin limitarse, de Oocito (sinónimo de ovocito) o célula germinal femenina.

5 Según otra realización preferida, la célula modificada genéticamente es una célula madre. Las células madre (o células troncales) son células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir tanto células diferenciadas como células no diferenciadas. Según el origen de las células madre se puede diferenciar entre células madre embrionarias y células madre adultas. La célula madre a la que se hace referencia en esta realización de la presente invención se refiere a una célula madre adulta, pero no embrionaria.

10 Según el origen de las células madre podemos diferenciar entre células madre embrionarias y células madre adultas. Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna de los blastocistos y tienen como característica principal el hecho de ser pluripotenciales, lo que significa que pueden dar lugar a cualquier tejido adulto derivado de las tres capas embrionarias (US 6.200.806).

15 Según una realización más preferida, la célula madre se selecciona de la lista que comprende pluripotente, multipotente o unipotente. La célula madre pluripotente (o pluripotencial) es capaz de diferenciarse a cualquier tipo de célula derivada de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo o endodermo) y como consecuencia, a cualquier tejido adulto derivado de cualquiera de dichas capas embrionarias pero no es capaz de formar un organismo completo. La célula madre multipotente (o multipotencial) puede generar células de su propia capa embrionaria de origen. La célula madre unipotente (o unipotencial) puede formar únicamente un tipo de célula particular.

20 Una realización preferida más se refiere a la célula modificada genéticamente donde el mamífero es un mamífero no humano. Según una realización más preferida, el mamífero es *Mus musculus* (ratón).

25 Otra realización preferida se refiere a una célula modificada genéticamente aislada de un mamífero no humano o de un ratón, donde dicha célula se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende oocito, blastómero, blastocito o célula embrionaria.

30 Un oocito (u ovocito) es una célula germinal femenina en un estadio de madurez previo al óvulo maduro. Un blastómero es la célula resultante de la segmentación del cigoto. Un blastocito es una de las células que forman el blastocisto. El término “célula embrionaria” tal como se entiende en la presente invención se refiere a una de las células que integran la masa celular que se implanta en el útero después de recorrer la trompa de Falopio.

35 En una realización más preferida de la célula modificada genéticamente, dicha célula es una célula madre. El término “células madre” tal como se entiende en la presente realización, se refiere a célula madre embrionaria. El comportamiento de dichas células como células madre, está condicionada por factores que pueden controlarse *in vitro* y que sin embargo *in vivo* no se mantienen constantes. Por tanto las células madre de esta realización preferida se obtienen de células en un estadio adecuado para permitir su comportamiento como células madre.

40 En adelante, para hacer referencia a cualquier célula modificada genéticamente descrita anteriormente, se utilizarán los términos “célula/s modificadas genéticamente de la invención” o “célula/s modificadas genéticamente de la presente invención”.

45 Cualquiera de las células modificadas genéticamente de la invención puede generar una línea celular derivada.

50 Otro aspecto de la presente invención es un mamífero no humano modificado genéticamente que contiene la célula modificada genéticamente de un mamífero o la célula modificada genéticamente de un mamífero no humano.

55 Una realización preferida se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente donde dicho mamífero es un ratón.

60 En adelante, para hacer referencia a cualquier mamífero no humano modificado genéticamente descrito anteriormente, se utilizarán los términos “mamífero/s modificados genéticamente de la invención” o “mamífero/s modificados genéticamente de la presente invención”.

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula modificada genéticamente de la invención para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y T.

70 El término “screening” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la exploración o ensayo de varios compuestos respecto a su capacidad moduladora de la homeostasis de células B y T.

75 Los compuestos que se emplean en dicho screening son compuestos candidatos derivados o no de otros compuestos líder. Los compuestos se pueden obtener mediante química combinatoria o a partir de fuentes naturales.

80 El término “capacidad moduladora de la homeostasis” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la capacidad de modificar los factores que intervienen en la homeostasis de un determinado proceso para obtener distintos resultados. La homeostasis se define como el conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.

85 Las células T son un tipo de linfocitos que se diferencian (especializan) inicialmente en el timo, y las células B son otro tipo de linfocito que se diferencian en el hígado y bazo fetal, y en la médula ósea del adulto. En la presente

invención se exploran o ensayan varios compuestos respecto a su capacidad para modificar el metabolismo normal de las células B y T, preferiblemente la capacidad de proliferación de dichas células.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de la célula modificada genéticamente de la invención que comprende:

- a) Obtener al menos una célula aislada procedente de un mamífero,
- 10 b) transfectar la célula del apartado (a) con un vector retroviral, capaz de insertar una secuencia nucleotídica en cualquier posición nucleotídica de una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, y
- 15 c) seleccionar la célula en la que la secuencia con al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 queda inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, en homocigosis o heterocigosis.

El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia conocidas en el estado de la técnica. El término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas.

La secuencia nucleotídica (apartado [b] del método) se inserta preferiblemente en un intrón de una secuencia nucleotídica con al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente la secuencia nucleotídica se inserta en cualquier posición nucleotídica del primer intrón.

De acuerdo con el apartado (c), se selecciona aquella célula en la que el producto de la expresión de la secuencia con al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 no es funcional.

Preferiblemente, el producto de la expresión es una proteína no funcional como consecuencia de la inactivación funcional o delección (o disruptión) total o parcial de su secuencia. La selección puede llevarse a cabo por medio del análisis del producto de la expresión de la secuencia con al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 mediante métodos de detección y/o cuantificación conocidos en el estado de la técnica.

Una realización preferida se refiere al método para la producción de la célula modificada genéticamente de la invención, donde la secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente de la invención que comprende:

- 40 a) Incorporar la célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 a un embrión,
- b) introducir el embrión del apartado (a) en un órgano sexual de un individuo hembra en condiciones donde dicho individuo sea capaz de desarrollar progenie, e
- 45 c) identificar al menos un descendiente de la progenie del apartado (b) que contiene la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, en homocigosis o heterocigosis.

50 La incorporación de la célula madre se lleva cabo preferiblemente mediante microinyección. La célula madre es totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente. Así pues, el oocito fecundado, es decir, el zigoto o célula huevo, es totipotente, es decir, es capaz de producir todos los tipos celulares que conforman a un individuo incluyendo la placenta. Sin embargo, el blastómero, el blastocito o la célula embrionaria, o cualquier otra célula de la masa celular interna, no son totipotentes porque no pueden dar lugar a una placenta, son pluripotentes, puesto que pueden dar lugar a células que integran cada uno de los tres tejidos o capas embrionarias, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. La pluripotencia de dichas células, es decir, su comportamiento como células madre, está condicionada por factores que pueden controlarse *in vitro* y que sin embargo *in vivo* no se mantienen constantes y por tanto, en condiciones *in vivo* sólo se comportarían como células madre en determinados momentos o etapas del desarrollo. El término “célula embrionaria” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la célula que procede de la masa celular que se implanta en el útero después de recorrer la trompa de Falopio.

En el apartado (b) del método, la introducción del embrión en un órgano sexual de un individuo hembra se lleva a cabo en condiciones donde dicho individuo sea capaz de desarrollar progenie. Dichas condiciones son, pero sin limitarse a, hembras pseudopregnadas, es decir, hembras que experimenten embarazo psicológico.

65 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente de la invención, donde el embrión del apartado (a) es un oocito fecundado, mórula o blastocisto.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente de la invención donde la incorporación de la célula madre del apartado (a) contribuye a todos los linajes celulares de dicho embrión. Los linajes celulares son aquellos que provienen de cualquiera de las tres capas embrionarias ya citadas en la presente invención.

5 Otra realización preferida de la invención es el método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente donde la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO: 1.

10 Otra realización preferida es el método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente de la invención, donde además comprende cruzar un descendiente identificado en el apartado (c) para producir mamíferos no humanos heterocigóticos en la modificación genética introducida. Además, otra realización aún más preferida se refiere al método para la producción del mamífero no humano, donde además comprende cruzar dos descendientes heterocigóticos para producir al menos un descendiente homocigótico en la modificación genética introducida.

15 Otro aspecto de la presente invención es el método para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y T que comprende:

- 20 a) Cultivar al menos una célula modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo,
- b) administrar un compuesto a la célula del apartado (a), o a dicho medio de cultivo, para generar al menos una célula tratada,
- 25 c) medir la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T en la célula tratada del apartado (b), y
- d) comparar dicha capacidad moduladora del apartado (c) con la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T que produce el compuesto del apartado (b) en células control.

30 El compuesto es una sustancia susceptible de ser moduladora, o potencialmente moduladora o simplemente una sustancia cuya capacidad moduladora de las células B y T se desea evaluar.

En apartado (d) del método se compara dicha capacidad moduladora del apartado (c) con la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T que produce el compuesto del apartado (b) en células control. Las células control pueden ser células no modificadas genéticamente o células modificadas genéticamente. Las células control modificadas genéticamente pueden producir la sobreexpresión de la proteína TC21. De este modo el método permite determinar la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T correctamente ya que la determinación de dicha capacidad en células control no modificadas genéticamente únicamente, no permitiría diferenciar entre sí el compuesto que modula dicha homeostasis lo hace por medio de la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 o a través de la expresión de otras secuencias. Es decir, el compuesto administrado a la célula del apartado (a) es útil para el objetivo de la presente invención siempre que dicho compuesto ejerza un efecto modulador de la homeostasis de las células B y T en las células control no modificadas genéticamente (o modificadas genéticamente que sobreexpresan la proteína TC21) y no ejerza dicho efecto modulador en la célula modificada genéticamente de la presente invención (o ejerza un efecto menor). Esta diferencia significa que el efecto modulador se lleva a cabo fundamentalmente a través la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1. La contribución de dicha secuencia nucleotídica a la modulación de la homeostasis se puede determinar restando las medidas de la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T en las células control de las medidas obtenidas en las células modificadas genéticamente de la invención.

50 Además, otro método para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y T comprende:

- 55 a) Seleccionar un individuo mamífero no humano modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9,
- b) administrar un compuesto al animal del apartado (a) para generar un animal transgénico tratado,
- c) medir la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T en el animal transgénico tratado del apartado (b), y
- 60 d) comparar dicha capacidad moduladora del apartado (c) con la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T que produce el compuesto del apartado (b) en un individuo mamífero no humano control.

65 El individuo mamífero no humano control puede estar modificado genéticamente o no modificado. El individuo mamífero no humano control modificado genéticamente puede producir la sobreexpresión de la proteína TC21.

Una realización preferida se refiere al método para el screening de compuestos en una célula modificada genéticamente de la invención o en un mamífero no humano modificado genéticamente de la invención, donde el compuesto

administrado es una secuencia de ácido nucleico capaz de formar un siRNA que híbrida con cualquier fragmento del RNA codificado por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1.

5 Una realización más preferida se refiere al método para el screening de compuestos, donde la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO: 1.

Para facilitar el entendimiento del texto que se describe a continuación y de los dos párrafos anteriores, se lleva a cabo una breve explicación de siRNAs o RNAs de interferencia.

10 Los siRNAs (de las siglas en inglés *small interference RNA*) son moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA de las siglas en inglés *double strand RNA*) de 20-21 nucleótidos, que se originan a partir de un dsRNA precursor más largo. Los dsRNAs precursores pueden ser de origen endógeno, en cuyo caso se habla de miRNA (codificados en el genoma del organismo) o de origen exógeno (como virus o transgenes). Tanto siRNA como miRNA son dos tipos de 15 RNAi (RNA de interferencia). El RNAi suprime la expresión post-transduccional de un determinado ARN mensajero reconocidos por la secuencia de RNAi.

20 Cuando una célula recibe un dsRNA precursor (los RNA de hebra simple no producen este efecto), que puede generarse a partir de un transgén exógeno, un agente viral o un elemento genético propio, se fragmenta en siRNAs por la acción de una enzima denominada Dicer, una enzima citoplásmica de la familia RNAsa III. Dicer corta el dsRNA en fragmentos de alrededor de 21-25 nucleótidos (siRNA), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del siRNA solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*) mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del siRNA determinan cual de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. 25 Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5', bien porque contenga un mayor contenido en bases AU o bien por apareamientos imperfectos. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional la hebra guía debe ser complementaria al mRNA que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al mRNA complementario de la hebra guía del siRNA presente en el complejo y se produce el corte del mRNA. Posteriormente se produce la degradación de los fragmentos obtenidos. De esta manera, los siRNAs provocan 30 el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de estas secuencias.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, o de SEQ ID NO: 1, como diana, en una célula de mamífero aislada, para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y T.

Una realización preferida de la invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, o de SEQ ID NO: 1, donde las células de mamífero son de humano o de ratón, pero sin limitarse a estas especies.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA que híbrida con cualquier fragmento del RNA codificado por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 2, o codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

45 La secuencia SEQ ID NO: 2 es la secuencia codificante (ADNc; secuencia que contiene sólo los exones) del gen *RRas2* de *Homo sapiens*. De igual modo que se ha descrito SEQ ID NO: 1, las secuencias con, al menos, un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 2 son secuencias homólogas del gen *RRas2* de mamíferos.

50 Una realización preferida de la invención se refiere a la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA donde dicha secuencia es capaz de formar un hpRNA.

Un hpRNA (del inglés *hairpin RNA*) es una horquilla formada por la hibridación de las secuencias nucleotídicas transcritas. Un hpRNA es un RNA de doble hebra (dsRNA) que es cortado por una endorribonucleasa, por ejemplo, la endorribonucleasa Dicer, dando como resultado fragmentos de alrededor de 21-25 pares de bases. Estos fragmentos se conocen como siRNA. Tal como se ha descrito anteriormente, los siRNAs provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de las secuencias de ARN mensajero. Es decir, el siRNA formado a partir de dicho hpRNA híbrida con cualquier fragmento del RNA codificado por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 2, o codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2 y, como consecuencia, se produce el silenciamiento post-transcripcional de dicha secuencia.

55 Según una realización más preferida de la invención, el hpRNA es un shRNA. Un shRNA es una secuencia de ARN que es capaz de formar una horquilla corta de ARN, más corta que en el caso de los hpRNA capaz de silenciar la expresión post-transcripcional vía ARN de interferencia, tal como se ha explicado anteriormente.

60 Otra realización más preferida de la invención es la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA donde dicha secuencia es capaz de formar un hpRNA o capaz de formar un shRNA, donde dicha secuencia comprende SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia nucleotídica que corresponde a las posiciones 434-452 de la secuencia que codifica para el gen *RRas2* de *Homo sapiens* (Número de acceso NM_012250). La secuencia SEQ ID NO: 4 es una secuencia nucleotídica que corresponde a las posiciones 829-847 de la secuencia que codifica para el gen *RRas2* de *Homo sapiens*. Para que SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 sean capaces de formar un hpRNA o un shRNA, es necesaria una

5 secuencia de unión y a continuación la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4. Es decir, a modo de ejemplo, la secuencia nucleotídica capaz de formar un hpRNA o un shRNA debe contener la siguiente estructura: SEQ ID NO: 3 - secuencia de unión - secuencia complementaria invertida de SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4 - secuencia de unión - secuencia complementaria invertida de SEQ ID NO: 4. Más concretamente, a modo de supuesto, la estructura sería la siguiente CCATTG - Secuencia de unión - CAATGG. Como puede observarse en este ejemplo 10 no vinculante, la secuencia de unión ejercerá la función de bisagra, de forma que se facilita la generación de las secuencias complementarias.

Otra realización preferida de la presente invención es un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA según se ha argumentado en los párrafos anteriores.

15 Una realización más preferida se refiere a una célula modificada genéticamente, aislada de un mamífero, transfec-
tada con el vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica capaz de generar dicho siRNA. Según esta
realización más preferida, la introducción en la célula de la secuencia nucleotídica que es capaz de formar un hpRNA
20 o un shRNA se lleva a cabo por medio de un vector de expresión que se encarga, por medio de una secuencia regu-
ladora de la expresión, de expresar dicho ADN y transcribirlo a ARN mensajero, formándose entonces la horquilla
ARN.

Otra realización preferida de la presente invención es la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA según
se ha argumentado en los párrafos anteriores o el vector que la comprende, para su uso en el tratamiento o prevención
25 de un cáncer hematopoyético. El cáncer hematopoyético al que se refiere la presente invención es una leucemia o un
linfoma. La leucemia se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, leucemia mieloide crónica (LMC),
leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (Leucemia Linfoblástica; LLA), leucemia mieloide aguda
(Leucemia Mieloblástica; LMA) o leucemia mielógena (LM).

30 Según una realización más preferida el cáncer hematopoyético es un linfoma. El linfoma se selecciona, pero sin
limitarse, de la lista que comprende, linfomas precursores de células T que producen leucemia linfoblástica precursora
aguada de células T (LLA-T), linfoma linfoblástico precursor de células T (LBL), linfoma periférico de célula T,
linfoma hepatoesplénico de células T gamma y delta, linfoma subcutáneo de células T, linfoma angioinmunoblastico
35 de células T, linfoma extranodal de células T de tipo nasal, linfoma intestinal de células T de tipo enteropático,
linfoma que produce leucemia de células T en adultos (HTLV 1 +), linfoma anaplásico de células grandes tipo cutáneo
primario, leucemia agresiva de células NK (Natural Killer); linfomas B no-Hodgkin como linfomas precursores de
células B: leucemia linfoblástica precursora aguda de células B (LLA-B, y linfoma linfoblástico precursor de células
40 B (LBL, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica de células B y linfoma linfocítico pequeño de células B,
leucemia prolinfocítica de células B, linfoma/inmunocitoma linfoplasmacítico, linfoma de células de manto, linfoma
folicular, linfoma extranodal de zona marginal de células B de tipo MALT, linfoma nodal de zona marginal de células
45 B (de células B ± monocitoide), linfoma esplénico de zona marginal (linfocitos ± vellosos), leucemia de células
pilosas, plasmacitoma y mieloma de células plasmáticas, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt;
linfomas Hodgkin como linfoma de Hodgkin nodular abundante en linfocitos y linfoma de Hodgkin clásico (linfoma
de Hodgkin con esclerosis nodular, linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos, linfoma de Hodgkin de celularidad
mixta, linfoma de Hodgkin con depleción de linfocitos).

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA según se ha
argumentado en los párrafos anteriores o el vector que la comprende para la elaboración de un medicamento destinado
50 al tratamiento o prevención de un cáncer hematopoyético. Según una realización preferida, el cáncer hematopoyético
es un linfoma.

El medicamento comprende, al menos, cualquier secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA según se ha
argumentado en los párrafos anteriores o del vector que la comprende. Dichas secuencias o vector, o sus derivados far-
macéuticamente aceptables, se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente
55 efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica capaz de generar
un siRNA según se ha argumentado en los párrafos anteriores o el vector que la comprende, donde el medicamento
incluye al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 En cada caso, la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello,
la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de
administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

65 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquier secuencia nucleotí-
dica capaz de generar un siRNA según se ha argumentado en los párrafos anteriores o del vector que la comprende,
estabiliza dichas secuencias o vector, o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia
o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los

5 ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

10 El término excipiente “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra. Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad de dichas secuencias o vector.

15 Otra realización preferida de la presente invención es el uso de la secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA según se ha argumentado en los párrafos anteriores o el vector que la comprende, donde el medicamento incluye al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

25 Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

35 Las figuras muestran experimentos representativos realizados al menos 4 veces con resultados similares.

Figura 1. *Muestra la asociación constitutiva de TC21 con el TCR a través de ITAM no fosforilados.*

(A). TC21 se asocia con todas las subunidades CD3. Se transfecaron células COS con las subunidades CD3 etiquetadas con Flag indicadas y se usó precipitación con GST-TC21 para recuperar proteínas de los lisados celulares en NP40. Se sondaron inmunotransferencias con anti-Flag y los lisados de células completas se inmunotransfrieron en paralelo como control de transfección. (B). TC21 se asocia con CD3 ζ preferiblemente en la forma unida a GDP. Las células COS se transfecaron conjuntamente con CD3 ζ -His(6x) y se indicaron cualesquiera de los mutantes TC21-GFP. Se realizó precipitación con perlas Ni-NTA. (C). TC21 interactúa directamente con un ITAM no fosforilado. Las proteínas de fusión con GST de los mutantes TC21 indicados se incubaron con un péptido sintético marcado con biotina correspondiente al primer ITAM no fosforilado de CD3 ζ (ζ A), o con la forma de doble tirosina fosforilada (ζ A-P), que se recuperó posteriormente con perlas de estreptavidina. (D). TC21 se asocia con el TCR independientemente de la activación. El clon celular 1D8 que expresaba CD3 ζ -His(6x) derivado de 2B4 se estimuló tanto con el anticuerpo anti-CD3 145-2C11 o pervanadato, y el complejo TCR se precipitó con perlas de Ni-NTA procedente de lisados celulares Brij96. Se sondaron inmunotransferencias con anti-TC21 para demostrar la asociación de la proteína endógena al TCR. (E). TC21 se transloca conjuntamente con el TCR en la sinapsis inmune (SI). Se estimularon células Jurkat transfecadas con TC21-DsRed y CD3 ζ -GFP con Raji APC (expresando establemente CFP) precargadas con SEE. Las imágenes seleccionadas a diferentes intervalos de tiempo se muestran para destacar la acumulación de TCR y TC21 en la IS. Las APC están rodeadas por un círculo en las imágenes aglomeradas. (F). TC21 está constitutivamente presente en una forma activa en células T y sólo parcialmente activada por el TCR. Se transdujeron células 1D8 con TC21-GFP y se estimularon con el anticuerpo anti-CD3 145-2C11, y se realizó ensayo de precipitación con GST-RBD. Se realizó en primer lugar una inmunotransferencia con anti-TC21 y posteriormente con anti-Ras. Se calcularon las intensidades relativas de las bandas de TC21 y Ras por densitometría. (G). TC21 se localiza conjuntamente con emplazamientos de actividad PI3K en la SI. Se transfecaron células Jurkat junto con TC21-GFP y PH-Akt-DsRed y se estimularon con Raji APC (rodeadas por un círculo) precargadas con SEE. Se muestran imágenes seleccionadas a diferentes intervalos de tiempo.

60 Esta y las Figuras posteriores muestran experimentos representativos realizados al menos 4 veces con resultados similares.

65 Figura 2. *Muestra cómo TC21 es necesario para la supervivencia de células T y la activación de Akt *in vitro*.*

(A). Pérdida de células que expresan dnTC21-GFP. Se transfecaron células T Jurkat y PBL humanas con dnTC21-GFP o con el vector vacío (GFP) y se cultivaron en ausencia de estímulo. Se estimó el porcentaje de células GFP $^+$

mediante citometría de flujo, tomando el valor de 100 a 1 día tras la transfección. (B). La expresión de dnTC21 induce apoptosis. Se transfecaron células Jurkat y de bazo de ratón con dnTC21-GFP ó con el vector vacío. Se estimó la inducción de apoptosis entre las poblaciones GFP⁺ 48 h después mediante anexina V y tinción 7-AAD, o a través del número de células con un contenido en ADN sub-G1. Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante. Se midieron los números totales de células de bazo GFP⁺ vivas por exclusión con bromuro de propidio. (C). Efecto sobre la activación de Akt. Se transfecaron células Jurkat con los mutantes TC21 indicados fusionados a GFP y se evaluó la expresión de fosfo-Akt 24 h después en las poblaciones GFP⁺ mediante citometría de flujo. El histograma sombreado representa fosfo-Akt en células control que expresaban únicamente GFP. Los números indican la intensidad de fluorescencia promedio (IFP). (D). Efecto dosis-respuesta. Se representan los valores de IFP de fosfo-Akt vs. GFP del experimento del panel C. (E). Reducción de la expresión de TC21 mediante ARNi. Se transfecaron células COS con TC21-GFP de tipo natural junto con cualesquiera de las construcciones de shRNA para TC21 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), una construcción shRNA irrelevante para EB1 (E1) ó con el vector vacío (ϕ). Se examinó la expresión de la proteína TC21 en inmunotransferencias sondeadas con anti-GFP y anti- α -tubulina como control de carga. (F y G). La transfección de construcciones de ARNi TC21 induce apoptosis (F) y reduce la actividad Akt (G). Se transfecaron células Jurkat junto con un vector que expresaba GFP y cualesquiera de las construcciones que comprenden SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o un vector shRNA vacío. Se determina la inducción de apoptosis (en porcentaje) y los niveles de fosfo-Akt (en IFP) 24 h después en las poblaciones GFP⁺.

Figura 3. Muestra cómo los ratones *TC21^{-/-}* tienen menos células B y T periféricas.

(A). Viñeta que ilustra el punto de inserción retrovírico en el intrón 1 del gen TC21 y las posiciones de los tres cebadores usados para la genotipificación. (B). Genotipificación por PCR. Una mezcla de los cebadores 1, 2 y 3 se usó para detectar los alelos de tipo natural (WT) y dirigido (KO) mediante PCR. (C). La proteína TC21 está ausente o disminuida en los ratones *TC21^{-/-}* y en los ratones *TC21^{+/+}* respectivamente. Se sondaron inmunotransferencias de extractos completos de timo procedentes de ratones con los genotipos TC21 indicados con un anticuerpo frente a TC21, y de nuevo Ras total y α -tubulinas como controles. (D). La deficiencia en TC21 da como resultado un aumento en la proporción de células T y una disminución en la proporción de células B en los ganglios linfáticos y bazo. El análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD19⁺ (1D3, células B) y TCR β ⁺ (H57, células T) en ratones de los genotipos indicados. 1D3 es el anticuerpo anti-CD19 y H57 es el anticuerpo anti-TCRbeta. (E). La deficiencia en TC21 reduce los números totales de células B y T en el bazo y ganglios linfáticos. Los números totales de células B y T (promedio ± desviación estándar de la muestra) se estimaron mediante citometría de flujo en grupos de 10 ratones. Un asterisco indica P<0,05; dos asteriscos: P<0,005; tres asteriscos: P<0,0005. (F). La deficiencia en TC21 reduce el número total de células linfoides y el peso del bazo. Se pesaron 10 bazos de cada genotipo y a continuación se contó el número total de células linfoides mediante citometría de flujo. (G). Pequeño tamaño folicular en bazos procedentes de ratones *TC21^{-/-}* y *TC21^{+/+}*. Microfotografías representativas de secciones de bazo con triple tinción con anticuerpos frente a TC21, CD3 (marcador de célula T) y B220 (marcador de célula B). Se muestra un único folículo para *TC21^{+/+}* y *TC21^{-/-}*, y la inserción de dos folículos *TC21^{+/+}*. La pulpa roja (la zona que rodea el área de la célula B) queda inespecíficamente teñida con los anticuerpos anti-TC21 y anti-CD3 (RP, claramente visible en la muestra *TC21^{-/-}*).

Figura 4. Muestra cómo la deficiencia en TC21 elimina células B ZM y evita la formación de CG.

(A). La deficiencia en TC21 elimina la población de células B ZM. La citometría de flujo de células de bazo de ratón con triple tinción con CD19, CD21 y CD23. Las células B foliculares (FO) (CD21^{int}CD23^{hi}) están rodeadas por un círculo gris y las células B ZM (CD21^{hi}CD23^{lo}) están rodeadas por un recuadro gris. (B). Los ratones *TC21^{-/-}* tienen menos FO y carecen casi completamente de células B ZM cuando se estimó el número total de células en los bazos de ratón (n=10). (C). Evidencia inmunohistoquímica de la desaparición de células B ZM. Se tiñeron secciones de tejido de bazo con un marcador de célula B (B220) y un marcador de macrófagos metalofílicos (MOMA-1) que separan las zonas folicular y marginal. La pulpa roja se tiñó de forma no específica por ambos anticuerpos en el bazo *TC21^{-/-}*. (D). TC21 se expresa fuertemente en los CG. Se tiñeron secciones de ganglios linfáticos de ratones no inmunizados con anti- TC21 y PNA como marcador CG. Los CG no fueron detectados en ratones *TC21^{-/-}*. (E). Los CG están ausentes en ratones *TC21^{-/-}*. Las secciones de ganglios linfáticos de ratones no inmunizados se tiñeron con un anticuerpo específico de la caspasa 3 activa. (F y G). Disminución de la respuesta CG en ausencia de TC21. Los ratones se inmunizaron con glóbulos rojos de sangre de oveja y 6 días después, los ganglios linfáticos se recogieron y las secciones se tiñeron con PNA y B220 para demostrar la presencia de los CG. La cuantificación del número de CG por sección procedente de grupos de 3 ratones se muestra a la derecha del panel F. El panel G muestra la tinción de las secciones de ganglios linfáticos procedentes de ratones inmunizados con el marcador de proliferación Ki-67. (H). Respuesta proliferativa reducida de linfocitos B contra un antígeno de recuerdo. Células de bazo procedentes de ratones inmunizados con TNP-KLH (n=3) se estimularon *in vitro* durante 48 h en presencia de TNP-BSA. Se evaluó la proliferación de célula B por incorporación de ³H-timidina.

Figura 5. Muestra cómo la deficiencia de TC21 reduce la supervivencia y proliferación homeostática de células B y células T CD8⁺.

(A y B). La proliferación homeostática de células B y células T CD8⁺ *TC21^{-/-}* se reduce en huéspedes linfopénicos. Se marcaron células de bazo y de ganglios linfáticos de ratones donantes *TC21^{+/+}* y *TC21^{-/-}* (n=3) con CFSE y se inyectaron i.v. en ratones C57BL/6 irradiados con una dosis subletal. Se obtuvieron el bazo y los ganglios linfáticos

13 días después y se analizaron para la expresión de CFSE en las poblaciones CD19⁺, CD4⁺ y CD8⁺. El índice de proliferación se calculó a partir del porcentaje de células encontradas en cada pico CFSE. (C). La supervivencia de células B y células T CD8⁺ disminuyó en ausencia de TC21. Se inyectaron i.v. números iguales de células de bazo procedentes de ratones donantes *TC21^{+/+}* y *TC21^{-/-}* (Ly5.2⁺) en ratones Ly5.1⁺ (n=4). Tres días después se estimó el porcentaje de células B (CD19⁺), células T CD4⁺ y células T CD8⁺ en las poblaciones inyectadas (positivas para el marcador Ly5.2) encontradas en los ganglios linfáticos y bazo. (D). Efecto de IL-7 sobre la supervivencia de células T *in vitro*. Se incubaron números iguales de células de ganglios linfáticos procedentes de ratones *TC21^{+/+}* y *TC21^{-/-}* (n=3) durante 24 h en presencia o ausencia de IL-7 10 ng/ml. El número de células T de tipo natural tras 24 h sin estímulo IL-7 se ajustó al 100%.

10 Figura 6. *Muestra la sobreexpresión de TC21 en linfomas de células T y B humanos.*

(A, B). Sobreexpresión de TC21 en linfomas humanos. Se estudió la expresión de TC21 en secciones de tejido humano incrustadas en parafina con un anticuerpo anti-TC21 y el tejido se contratiñó con hematoxilina-eosina. Se muestra una biopsia de piel (25x) de un paciente con linfoma de células T cutáneo (*micosis fungoides*) mostrando una placa con fuerte tinción citoplasmática en células malignas intraepiteliales. La sección (25x) de ganglio linfático de un paciente con DLBCL centroblástico mostrando fuerte tinción citoplasmática y núcleos límpidos. La sección (40x) de ganglio linfático de un paciente con linfoma de Hodgkin clásico muestra intensa tinción citoplasmática y fuerte reactividad en células Reed-Sternberg (RS). Se muestra una sección (25x) de ganglio linfático de un donante sano para comparación. CG, centro germinal. El panel (B) muestra sobreexpresión de TC21 en immunotransferencias de extractos en detergente de ganglios linfáticos procedentes de dos pacientes con DLBCL (muestras 886 y 6063) comparados con un ganglio linfático normal.

Ejemplos

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

30 En los ejemplos siguientes se hace referencia a TC21. TC21 (Rras2 o R-ras2) es una proteína codificada por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 o al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 2 (secuencias nucleotídicas codificantes de la proteína TC21 de *Mus musculus* y *Homo sapiens* respectivamente). En cada caso se hace referencia a un tipo concreto de TC21.

Ejemplo 1

40 *TC21 se asocia constitutivamente con el TCR a través de sus ITAM*

En una búsqueda de nuevos ligandos intracelulares de las subunidades CD3, los autores identificaron TC21 como una proteína que interactúa con la cola citoplasmática de CD3 γ (datos no mostrados) usando un sistema de alistaimiento SOS de levadura doble híbrido (Aronheim. 2001. Methods Mol Biol, 177: 319-328). Usando una proteína de fusión GST-TC21 en ensayos de precipitación de lisados procedentes de células COS transfectadas con diferentes subunidades CD3, los autores encontraron que TC21 puede interactuar con CD3 γ y el resto de subunidades CD3 del complejo TCR (Fig. 1A). Para determinar si las subunidades CD3 se enlanzan preferentemente con TC21 tanto activa como no activa, los autores transfecaron simultáneamente y constitutivamente mutantes activos o inactivos de TC21 junto con CD3 ζ y analizaron las proteínas coprecipitadas. CD3 ζ interactúa claramente con TC21-GDP (dnTC21, inactivo) y se enlaza más débilmente con TC21-GTP (oncoTC21, activo, Fig. 1B).

55 El ITAM es el único motivo conocido común a las colas de las cuatro subunidades CD3. Para evaluar si TC21 interactúa directamente con estos ITAM los autores incubaron las proteínas GST-TC21 purificadas con un péptido sintético biotinilado correspondiente al motivo ITAM ζ A de CD3 ζ , como ITAM representativo. Para estudiar el efecto de la fosforilación de la tirosina sobre la unión de TC21, se preparó igualmente el péptido p ζ A en la forma doblemente fosforilada (ζ A-P). Se determina una interacción específica y directa entre TC21 y el péptido sintético ζ A (Fig. 1C). Además, dnTC21 se unió a ζ A mejor que oncoTC21, y a ζ A mejor que a ζ A-P. Por tanto, parece que TC21 interactúa preferiblemente en su forma GDP, y con ITAM no fosforilados.

60 Para evaluar si TC21 interactúa con el TCR en células T, los autores precipitaron el TCR procedente de un derivado del hibridoma T de ratón 2B4 expresando una versión de CD3 ζ etiquetada con His. TC21 precipita conjuntamente con el TCR sin depender de si las células T se habían estimulado anteriormente, ya sea con anticuerpos anti-CD3 como con el activador farmacológico pervanadato (Fig. 1D). Así, TC21 se asocia en forma TC21-GDP con el TCR en células T independientemente de la fosforilación de los ITAM.

65 Mediante la aposición estrecha de sus membranas celulares, las células T forman una sinapsis inmune (SI) cuando entra en contacto con APC cargada de antígeno, a la que el TCR transloca (Dustin. 2008. Immunol Rev, 221: 77-89). Puesto que TC21 interactúa con el TCR (Fig. 1D), los autores evaluaron si TC21 fue alistado en la SI en células

vivas. En videomicroscopía confocal con lapso de tiempo de fluorescencia *en vivo*, TC21-DsRed se concentró en la SI de células T Jurkat humanas estimuladas con Raji APC cargadas con superantígeno en un intervalo de tiempo idéntico al alistamiento de TCR (tal como se detecta mediante transfección conjunta con CD3 ζ -GFP; Fig. 1E). El punto más temprano en el que se detecta un aumento en la concentración del TCR en la SI (2 minutos) coincidía con el aumento en la concentración de TC21 en el mismo punto (Fig. 1E), evidencia adicional de que TCR y TC21 se asocian físicamente.

Con el fin de investigar el efecto de TCR desencadenando la actividad de TC21, los autores usaron GST-Raf1-RBD para precipitar TC21-GTP tras estimulación de la célula T. únicamente las formas GTP de Ras y TC21 se asociaron con Raf1-RBD. Mientras que los niveles de Ras-GTP eran relativamente bajos en células Jurkat en reposo, se incrementaron 10 veces cuando los TCR fueron estimulados con un anticuerpo anti-CD3 (Fig. 1F). Por el contrario, TC21-GTP significativamente ya aparecía en las células T no estimuladas, y sus niveles sólo aumentaron ligeramente tras la estimulación del TCR (1,6 veces). Por tanto, aunque el estímulo de TCR promueve la activación de TC21 también está constitutivamente activo en células en reposo.

El estímulo de TCR induce la activación de las PI3K clase IA provocando la translocación de PH-Akt hacia la SI (Costello *et al.* 2002. Nat Immunol, 3: 1082-1089). Puesto que TC21 se alista en la SI junto con el TCR, los autores estudiaron si la translocación de TC21 a la SI iba acompañada de un aumento en la actividad de PI3K. Los autores encontraron que PH-Akt-DsRed se concentraba en la SI de células Jurkat:Raji en el mismo intervalo de tiempo y de la misma forma que TC21-GFP (Fig. 1G). Así, estos datos sugieren un papel para TC21 en la estimulación mediante TCR de la actividad de PI3K en la SI.

Ejemplo 2

25 La interferencia con la actividad de TC21 estimula una pérdida rápida de la viabilidad de la célula T

Para estudiar el papel de TC21 en la función de TCR, los autores transfecaron células Jurkat con dnTC21 fusionado a GFP para seguir la inducción de los marcadores de activación CD69 y CD25 tras estímulo con anticuerpos anti-CD3. Los autores no encontraron ningún defecto en la sobreexpresión de estos marcadores (datos no mostrados), aunque hubo una disminución en el número de células GFP⁺ independientemente de la estimulación. La pérdida de expresión de GFP fue más pronunciada en células Jurkat transfecadas con dnTC21-GFP que en células transfecadas únicamente con GFP (Fig. 2A). El efecto de dnTC21 fue incluso más claro en células T primarias humanas transfecadas (Fig. 2A, PBL). Puesto que las células Jurkat transfecadas con dnTC21-GFP expresaron más fuertemente el marcador de la apoptosis anexina V y su ADN genómico resultó fragmentado, la pérdida de la expresión GFP parecía debida a la inducción de apoptosis y no al silenciamiento génico o dilución del plásmido transfecido (Fig. 2B). De nuevo, la apoptosis inducida por la expresión de dnTC21-GFP fue más evidente en células primarias, y cuando se transfecaron en células T de bazo de ratón, la tinción de la anexina V indicó que todas las células transfecadas experimentaron apoptosis. Además, el número total de células GFP⁺ de bazo disminuyó 3 veces (Fig. 2B, abajo a la derecha).

La apoptosis inducida por dnTC21 podría estar regulada por la actividad Akt y, por tanto, los autores determinaron que la transfección de dnTC21-GFP en células Jurkat redujo la cantidad de Akt activo detectado con un anticuerpo específico de fosfo-Akt. Por el contrario, la transfección de oncoTC21-GFP y el TC21-GFP de tipo natural incrementaron los niveles de fosfo-Akt por encima de los de las células control transfecadas con GFP (Fig. 2C). Además, ambos efectos de dnTC21 y oncoTC21 sobre fosfo-Akt fueron dependientes de la dosis (Fig. 2D). Así, TC21 parece tener influencia sobre la supervivencia de la célula T mediante la activación de la ruta PI3K/Akt.

Ejemplo 3

50 Uso de shRNA (ARN de interferencia, ARNi) para la silenciación post-transcripcional de TC21

Puesto que los activadores y efectores de TC21 son comunes a proteínas Ras clásicas (Ehrhardt *et al.* 2002. Exp Hematol, 30: 1089-1106), el efecto del dnTC21 puede que no sea específico del TC21 únicamente. Así, los autores diseñaron dos construcciones de shRNA (las construcciones comprenden las secuencias SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4) que eliminaron específicamente la expresión de TC21. Para que SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 sean capaces de formar un hpRNA o un shRNA, es necesaria una secuencia nucleotídica de unión y a continuación la secuencia complementaria de SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4. Es decir, la secuencia nucleotídica capaz de formar un hpRNA o un shRNA contiene la siguiente estructura: SEQ ID NO: 3 - secuencia de unión - secuencia complementaria invertida de SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 4 - secuencia de unión - secuencia complementaria invertida de SEQ ID NO: 4. Cuando ambas construcciones se transfecaron en células COS junto con TC21-GFP, se observó una fuerte reducción en la expresión de TC21 en comparación con la producida por un vector de control vacío o una construcción irrelevante (Figura 2E). La transfección de las construcciones que comprenden SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 en células Jurkat aumentó la proporción de células apoptóticas en 2 veces (Fig. 2F) y redujo los niveles de fosfo-Akt en un 28% en células no estimuladas (Fig. 2G). Por tanto, el uso de ARNi confirma el importante papel que juega TC21 en la supervivencia de la célula T *in vitro* mediante la activación de la ruta PI3K-Akt.

Ejemplo 4

El fenotipo de ratones deficientes en TC21 demuestra un papel esencial de TC21 en el mantenimiento de los números de células B y T periféricas

5 Para estudiar el papel de TC21 en el desarrollo de la célula T y en la supervivencia de la célula T *in vivo*, los autores investigaron en la base de datos Omni Bank (<http://www.lexgen.com>) de clones de células ES con inserciones retrovíricas e identificaron un clon que contenía una copia del retrovirus integrada en el intrón del gen TC21 (Fig. 3A). Usando este clon ES, se obtuvo una línea de ratón con el gen TC21 dirigido, y se realizó un ensayo PCR para distinguir entre los genes intacto y TC21 dirigido (Fig. 3B). Cuando se genotipificó la progenie de los cruces heterocigóticos de 10 $TC21^{+/-}$, los autores encontraron una ligera desviación de los índices mendelianos normales en ratones recién nacidos. El alelo dirigido se expresó menos que la frecuencia esperada tanto en ratones homocigóticos como heterocigóticos (21% de $TC21^{-/-}$, 49% de $TC21^{+/-}$ n= 378), mientras que el alelo de tipo natural se expresó con frecuencia mayor únicamente en homocigosis (30% $TC21^{+/+}$). Esto indica que TC21 juega un papel importante durante el desarrollo 15 embrionario.

20 La proteína TC21 fue indetectable en timo completo en lisados procedentes de ratones $TC21^{-/-}$ de 6 semanas de edad y, de manera interesante, los niveles de la proteína TC21 fueron inferiores en ratones $TC21^{+/-}$ que en $TC21^{+/+}$, indicando un efecto dependiente de dosis de gen (Figura 3C). Esto sugiere que la expresión de la proteína TC21 está 25 estrechamente regulada.

25 Los autores estudiaron el efecto de la deficiencia de TC21 sobre la función de TCR analizando en primer lugar si se afectaba el desarrollo de la célula T. Se produjo una distribución normal de las poblaciones tímicas en ratones jóvenes sin depender de la dosis del alelo TC21 dirigido (datos no mostrados). Igualmente, la pérdida de TC21 no afectó al desarrollo de la célula B y el porcentaje de células B inmaduras fue similar en ratones $TC21^{+/+}$, $TC21^{+/-}$ y $TC21^{-/-}$. Sin embargo, la deficiencia de TC21 produjo un efecto consistente sobre los números de linfocitos T y B en los órganos linfoides periféricos. El porcentaje de células $\alpha\beta$ T en los ganglios linfáticos fue ligeramente mayor en ratones $TC21^{-/-}$ y $TC21^{+/-}$ que en ratones $TC21^{+/+}$, mientras que el porcentaje de células B disminuyó (Fig. 3D). Se observó un efecto similar en el bazo (Fig. 3D), un efecto que se reflejó por un aumento en el cociente célula T:B (Fig. 3E). Sin embargo, a pesar del incremento en la proporción de células T, los ratones $TC21^{-/-}$ sufrieron una reducción del 30% en el número total de células T en el bazo cuando se comparó con los ratones $TC21^{+/+}$. El efecto de la deficiencia de TC21 sobre los números de células B en el bazo fue más fuerte, produciendo una reducción del 50% (Fig. 3E) y explicando por qué el cociente T:B aumentó en ratones deficientes en TC21. Así, la deficiencia en 30 TC21 origina una reducción en el número de células T y B en el bazo, aunque las células B experimentan un efecto mucho más importante. La reducción de células linfoides fue también evidente cuando se estimó el número total de 35 células linfoides del bazo, con una reducción del 40% en ratones $TC21^{-/-}$ y $TC21^{+/-}$ (Fig. 3F, arriba). Más aún, los bazos de los ratones $TC21^{-/-}$ y $TC21^{+/-}$ fueron claramente más pequeños que los de los ratones $TC21^{+/+}$ (Fig. 3F, abajo), y los folículos fueron mucho más pequeños, con pocas células en las zonas T y B (Fig. 3G). En su conjunto, estos datos demuestran que TC21 es necesario para mantener normales los números de células T, y especialmente 40 de células B en el bazo. Notablemente, los ratones heterocigóticos tienen un fenotipo similar a los ratones homocigóticos $TC21^{-/-}$ (Fig. 3D a G), sugiriendo que un gen TC21 es insuficiente para mantener un número de linfocitos normal.

Ejemplo 5

45 *La deficiencia de TC21 afecta fuertemente a células B de la zona marginal y la formación de centros germinales*

Las células B esplénicas maduras pueden considerarse como células B foliculares (FO) que pueden circular en diferentes tejidos y células B de la zona marginal (ZM) que son residentes permanentes de larga vida en el bazo. Para 50 determinar cómo la deficiencia de TC21 afecta a ambos tipos de célula B, se analizó la expresión de los marcadores CD21 y CD23 en células CD19⁺ procedentes del bazo. Según esto, mientras que los ratones $TC21^{-/-}$ mostraron una reducción de 5 veces en la población de células B ZM (CD21^{hi}CD23^{lo}), hubo un aumento relativo en la proporción de células B FO (CD21^{int}CD23^{hi}) cuando se comparó con sus equivalentes $TC21^{+/+}$ (Fig. 4A). Sin embargo, una estimación del número absoluto de células reveló una reducción en ambas poblaciones celulares en los ratones $TC21^{-/-}$, 55 mientras que el efecto sobre las células B ZM fue mayor (Fig. 4B). Significativamente, el fenotipo de los ratones heterocigóticos $TC21^{+/-}$ fue intermedio.

Para verificar el defecto en células B ZM, los autores examinaron secciones de tejido de bazo con un marcador de célula B general y con MOMA-1, un marcador de macrófagos metalofílicos que delinean la división espacial entre 60 células B ZM y FO. Los ratones $TC21^{-/-}$ y $TC21^{+/-}$ mostraron una clara disminución de células B ZM, situadas entre los macrófagos MOMA-1+ y la pulpa roja (Fig. 4C). A pesar del efecto de la deficiencia de TC21 sobre las poblaciones de células B FO y ZM, no fue evidente una influencia significativa sobre las células B1, un tercer tipo de células B maduras especialmente enriquecidas en las cavidades corporales (datos no mostrados).

65 Para determinar si el efecto de la deficiencia de TC21 sobre los linfocitos es intrínseco de la célula, los autores realizaron experimentos de reconstitución de médula ósea en ratones deficientes en RAG2. En ratones $RAG2^{-/-}$ está completamente abolido el desarrollo de los linfocitos T y B y, así, los autores inyectaron de forma intravenosa células de médula ósea procedentes de ratones $TC21^{+/+}$ y $TC21^{-/-}$ a ratones $RAG2^{-/-}$ sometidos a una dosis sub-

letal de radiación. Tras reconstitución con médula ósea procedente de ratones $TC21^{+/+}$, se detectaron células B y T en el bazo y ganglios linfáticos. Cuando se inyectó médula ósea procedente de ratones $TC21^{-/-}$ se produjo un aumento en el cociente célula T:B, comparado con el inyectado con médula ósea de tipo natural, y las células B ZM estuvieron virtualmente ausentes (datos no mostrados) reproduciendo el fenotipo de los ratones $TC21^{-/-}$. Estos resultados indican que el efecto de la deficiencia de TC21 sobre las poblaciones linfoides es intrínseco de la célula.

Los centros germinales (CG) se forman en el bazo y ganglios linfáticos tras la estimulación con antígeno de células B y son áreas de intensa proliferación, apoptosis, cambio de tipo de Ig, y maduración de la afinidad (Klein y Dalla-Favera. 2008. Nat Rev Immunol, 8: 22-33) Se han detectado CG en ganglios linfáticos de ratones $TC21^{+/+}$ teñidos con el marcador específico de CG aglutinina de cacahuete (PNA). Las células de los CG expresaron intensamente TC21, más que las zonas foliculares circundantes (Fig. 4D). Sin embargo, los CG estaban ausentes de los ganglios linfáticos de ratones $TC21^{-/-}$. La caspasa 3 activa, un marcador de células apoptóticas, se concentró en los CG de los ganglios linfáticos de los ratones $TC21^{+/+}$, mientras que en los ratones $TC21^{-/-}$ las células apoptóticas están dispersas (Fig. 4E), evidencia adicional de la pérdida de CG en ratones $TC21^{-/-}$. El tamaño y número de los CG aumenta tras la exposición al antígeno, de manera que los autores ensayaron adicionalmente si TC21 es necesario para la formación de CG analizando ganglios linfáticos tras inmunización con eritrocitos de oveja. Los ganglios linfáticos de ratones $TC21^{+/+}$ y especialmente $TC21^{-/-}$ contenían menos CG y más pequeños que los ratones $TC21^{+/+}$ cuando se ensayaron con PNA (Fig. 4F) y el marcador de proliferación Ki-67 (Fig. 4G). De este modo, la formación de CG parece estar fuertemente inhibida en ratones deficientes en TC21. Según esto, la proliferación de células B *in vitro* en respuesta a un antígeno quedó inhibida (Fig. 4H). Además, la respuesta secundaria al antígeno dependiente de T quedó desequilibrada en ratones $TC21^{-/-}$ y $TC21^{+/+}$ en todos los subtipos de Ig detectables, pero especialmente en IgG3 (datos no mostrados). Por el contrario, la respuesta para antígenos independientes de T de tipo I y tipo II no quedó significativamente alterada en los ratones deficientes en TC21.

25 Ejemplo 6

TC21 es necesario para la supervivencia y proliferación homeostática de células T y B

Para explicar por qué los números de linfocitos T y B se redujeron en los ratones $TC21^{-/-}$, los autores realizaron experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos maduros en ratones tanto linfopénicos como normales. De esta forma, se mediría la capacidad de los linfocitos $TC21^{-/-}$ para proliferar y llenar nichos vacíos (proliferación homeostática), y su capacidad para sobrevivir en ausencia de proliferación. Cuando se marcaron linfocitos $TC21^{-/-}$ con el marcador fluorescente CFSE y se transfirieron a ratones C57/BL6 linfopénicos irradiados, proliferaron menos que los linfocitos $TC21^{+/+}$ (según se detectó mediante dilución de fluorescencia, Fig. 5A). Este efecto se observa claramente en células B y células T CD8⁺, pero no en células T CD4⁺ (Fig. 5B). Por tanto, parece que TC21 es necesario para la proliferación homeostática tanto de células T CD8⁺ como de células B, pero no para las células T CD4⁺.

Para examinar el efecto de la deficiencia en TC21 sobre la supervivencia de células T y B, se inyectaron células de bazo procedentes de ratones $TC21^{+/+}$ o $TC21^{-/-}$ en ratones Ly5.1+ con todos los linfocitos. Los ratones donantes expresaban el alelo Ly5.2 del marcador de célula hematopoyética CD45 y así, se podía seguir el destino de las células inyectadas con anticuerpos frente a Ly5.2. La proporción de células CD8⁺ T y B entre la población de Ly5.2⁺ detectada tres días después de la inyección fue significativamente menor en ausencia de TC21 cuando se comparó con células $TC21^{+/+}$ (Fig. 5C). Por tanto, parece que TC21 mantiene la supervivencia de células B y T *in vivo*. Además, la supervivencia *in vitro* de células T también se redujo en ausencia de TC21, independientemente de la adición de IL-7 exógena (Fig. 5D).

50 Ejemplo 7

TC21 se sobreexpresa en cánceres linfáticos

Puesto que TC21 parece tener influencia sobre la supervivencia de células T y B, los autores examinaron si TC21 debería asociarse con cánceres linfáticos, quizás intensificando o prolongando señales de supervivencia. Puesto que se ha documentado la sobreexpresión de TC21 en diferentes carcinomas, los autores examinaron la distribución de TC21 en secciones de tejido de diferentes linfomas humanos de células T y B. TC21 estaba sobreexpresado en linfoma cutáneo de células T (3 de 3 casos, Fig. 6A, y datos no mostrados) así como en diferentes linfomas de Hodgkin y no Hodgkin de células B. Los linfomas de células B con fuerte expresión de TC21 incluyen linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, 68 de 80 casos) y linfoma de Hodgkin (HL, 60 de 60 casos, véase la Fig. 6A). Las 68 muestras de DLBCL en las que TC21 estaba sobreexpresado incluyeron linfomas Bcl6⁺ y Bcl6⁻ (datos no mostrados), sugiriendo que la sobreexpresión de TC21 se produce en linfomas tanto derivados de CG como posderivados de CG. El HL clásico es también un linfoma CG caracterizado por la presencia de células Reed Sternberg multinucleadas, el citoplasma de las cuales fue fuertemente marcado con anti-TC21 (Fig. 6A). También se encontró que la proteína TC21 se sobreexpresaba en dos muestras de DLBCL analizadas mediante inmunotransferencia, cuando se compara con los ganglios linfáticos normales (Fig. 6B). Este resultado valida los datos de inmunotinción y refuerzan la idea de que TC21 está sobreexpresado en los linfomas humanos.

Procedimientos experimentales

Células y ratones

5 La línea Jurkat de linfoma de células T humano, el derivado CD3 ζ -negativo del hibridoma murino 2B4 (MA5.8), la
 línea Raji de linfoblastoide de células B humano y la línea de células de mieloma J5778 y sus derivados (generosamente proporcionados por el Dr. Michael Reth, Universidad de Freiburg, Alemania) se hicieron crecer en RPMI + suero fetal bovino al 5% (FBS). El clon 1D8 fue derivado de MA5.8 tras transfección con una construcción CD3 ζ -His(6x) en el vector de expresión pSR α y selección en G418. Los ratones deficientes en TC21 se generaron en Lexicón Genetics
 10 y se derivaron del clon ES OST361011 con una inserción retrovírica VICTR37 en mitad del intrón 1. Los ratones heterocigóticos se cruzaron y las carnadas se genotipificaron mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: SEQ ID NO: 5 (cebador directo en el intrón 1 de TC21); SEQ ID NO: 6 (cebador reverso en el intrón 1 de TC21), SEQ ID NO: 7 (cebador reverso en el LTR retroviral insertado), que se usaron en todos los experimentos. Los ratones transgénicos TC21 $^{+/+}$ y TC21 $^{-/-}$ para OT1 TCR (OVAp específico, H-2Kb restringido) se obtuvieron cruzando ratones
 15 heterocigóticos.

Plásmidos y anticuerpos

20 TC21-GFP y TC21-DsRed se obtuvieron mediante clonación por PCR de la secuencia de ADNc humana de tipo natural en pEGFP-C1 y pDsRed2, respectivamente (Clontech). Las construcciones dnTC21 y oncoTC21 se crearon introduciendo una mutación S28N y G23V en TC21-GFP usando el kit de mutagénesis dirigida al emplazamiento (Stratagene). GST-TC21 se generó insertando el ADNc de TC21 en el vector pGEX-4T3 (Pharmacia), y la proteína de fusión se generó según indicaba el fabricante. Las construcciones de TC21 shRNA que comprenden SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, correspondiente a las posiciones 434-452 y 829-847 de la secuencia de ADNc humano, se prepararon en el plásmido pRNA-H1.1/neo de Genscript. Las construcciones PH-Akt-DsRed, GST-RBD y HA-LMP2A fueron generosamente suministrados por los doctores Santos Mañes (CNB, Madrid), Doreen Cantrell (Universidad de Dundee, GB), y Chris Dawson (Universidad de Birmingham, GB). Los plásmidos que expresaban subunidades CD3 humanas etiquetadas con flag se han descrito con anterioridad (Delgado y Alarcón. 2005. J Exp Med, 201: 555-566).

30 Se generó un antisuero de conejo específico frente a TC21 inmunizando conejos Nueva Zelanda con una proteína de fusión GST-TC21 purificada.

Selección de la levadura doble híbrido

35 Se usó el sistema Cytotrap (Stratagene) para seleccionar una biblioteca de ADNc de bazo humano (Stratagene) respecto de proteínas que interactúan con la cola citoplasmática de CD3 γ según se ha descrito (Gil *et al.* 2002. Cell, 109: 901-912).

Inmunoprecipitación, ensayos de precipitación y videomicroscopía de lapso de tiempo

40 Todos estos procedimientos se realizaron según se ha descrito anteriormente (Gil *et al.* 2002. Cell, 109: 901-912).

Experimentos de transferencia adoptiva

45 Para los procedimientos de proliferación homeostática se marcaron un total de, 10x10⁶ células procedentes de ganglios linfáticos y bazo de ratones TC21 $^{+/+}$ y TC21 $^{-/-}$ con CFSE (Molecular Probes) y se inyectaron i.v. en ratones C57/BL6 irradiados con dosis sub-letal (600 rad). Las células de los ganglios linfáticos y bazo procedentes de los ratones aceptores se analizaron 13 días después mediante citometría de flujo.

50 Para los experimentos de supervivencia *in vivo*, 10x10⁶ células de bazo procedentes de ratones TC21 $^{+/+}$ y TC21 $^{-/-}$ (expresando Ly5.2) se inyectaron i.v. en ratones C57/BL6 (Ly5.1⁺) y 3 días después los ganglios linfáticos y células de bazo de los ratones aceptores se analizaron mediante citometría de flujo usando anticuerpo anti-Ly5.2 para rastrear las células inyectadas.

55 Para la reconstitución de la médula ósea, se inyectaron i.v. 5x10⁶ células de la médula ósea en ratones RAG2 $^{-/-}$ irradiados con una dosis subletal (400 rad). Las células procedentes de los órganos linfoides de los ratones aceptores se analizaron mediante citometría de flujo 5 semanas después de la transferencia celular.

Supervivencia y proliferación *in vitro*

60 Para medir la supervivencia *in vitro*, las células de los ganglios linfáticos se cultivaron en RPMI con FBS al 10%, β ME (10 μ M) y piruvato de sodio (50 mM) con o sin IL7 (10 ng/ml, Preprotech). Se estimó el número de células vivas mediante FAC aplicando exclusión IP y comparando con las perlas de recuento. El número total de células T se estimó mediante tinción FAC y recuento celular.

La proliferación de células B en respuesta al antígeno de recuerdo se analizó *in vitro* mediante la incorporación de ³H-timidina tras estímulo con TNP-BSA de células de bazo procedentes de ratones *TC21^{+/+}* y *TC21^{-/-}* preinmunizados. Para la inmunización, se inyectaron i.p. 100 µg de TNP-KLH en coadyuvante completo de Freund, dos semanas después se reinoculó otra dosis de 100 µg en coadyuvante incompleto, y finalmente se sacrificaron 1 mes después de

5 la primera inmunización.

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica tanto de tejidos congelados como de preparaciones en parafina según se ha descrito
10 (Cúbelos *et al.* 2007. Cereb Cortex, 21: 21).

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se muestran como media ± desviación estándar de la muestra. Se usó el test Mann-Whitney
15 de dos colas para evaluar los intervalos de confianza.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula aislada procedente de un mamífero no humano, modificada genéticamente, que comprende al menos una mutación insercional en una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia nucleotídica está inactivada.
- 10 2. Célula según la reivindicación 1, donde la mutación insercional se produce en el primer intrón de dicha secuencia nucleotídica.
- 15 3. Célula aislada procedente de un mamífero no humano, modificada genéticamente, que comprende el producto de expresión de una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, donde dicho producto de expresión está inactivado mediante un siRNA codificado por una secuencia que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 o la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 20 4. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 es la propia SEQ ID NO: 1.
- 25 5. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha célula es somática o germinal.
- 30 6. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la célula es una célula madre.
- 35 7. Célula según la reivindicación 6, donde la célula madre se selecciona de la lista que comprende pluripotente, multipotente o unipotente.
- 40 8. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho mamífero no humano es *Mus musculus* (ratón).
- 45 9. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la célula se selecciona de la lista que comprende oocito, blastómero, blastocito o célula embrionaria.
- 50 10. Mamífero no humano modificado genéticamente que contiene la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 55 11. Mamífero no humano modificado genéticamente según la reivindicación 10, donde dicho mamífero es un ratón.
- 60 12. Uso de la célula modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o de células T.
- 65 13. Método para la producción de la célula modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, y 4 a 9 que comprende:
- 70 a) Obtener al menos una célula aislada procedente de un mamífero no humano,
- 75 b) transfectar la célula del apartado (a) con un vector retroviral, capaz de insertar una secuencia nucleotídica en cualquier posición nucleotídica de una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, y
- 80 c) seleccionar la célula en la que la función de la secuencia con al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 queda inactivada, en homocigosis o heterocigosis.
- 85 14. Método para la producción de la célula modificada genéticamente según la reivindicación 3 que comprende:
- 90 a) Obtener al menos una célula aislada procedente de un mamífero no humano,
- 95 b) transfectar la célula del apartado (a) con un siRNA codificado por una secuencia que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 o la secuencia SEQ ID NO: 4, y
- 100 c) seleccionar la célula en la que el producto de expresión de una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, queda inactivada.
- 105 15. Método para la producción de un mamífero no humano modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 que comprende:
- 110 a) Incorporar la célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 a un embrión,
- 115 b) introducir el embrión del apartado (a) en un órgano sexual de un individuo hembra en condiciones donde dicho individuo sea capaz de desarrollar progenie, e

- c) identificar al menos un descendiente de la progenie del apartado (b) que contiene la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 inactivada, en homocigosis o heterocigosis.
- 5 16. Método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente según la reivindicación 15, donde el embrión del apartado (a) es un oocito fecundado, mórula o blastocisto.
- 10 17. Método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 donde la incorporación de la célula madre del apartado (a) contribuye a todos los linajes celulares de dicho embrión.
- 15 18. Método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO: 1.
19. Método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que además comprende cruzar un descendiente identificado en el apartado (c) para producir mamíferos no humanos heterocigóticos en la modificación genética introducida.
- 20 20. Método para la producción del mamífero no humano modificado genéticamente según la reivindicación 19, que además comprende cruzar dos descendientes heterocigóticos para producir al menos un descendiente homocigótico en la modificación genética introducida.
- 25 21. Método para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o de las células T que comprende:
- a) Cultivar al menos una célula modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo,
 - b) administrar un compuesto a la célula del apartado (a), o a dicho medio de cultivo, para generar al menos una célula tratada,
 - c) medir la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y/o de las células T en la célula tratada del apartado (b), y
 - 35 d) comparar dicha capacidad moduladora del apartado (c) con la capacidad moduladora de la homeostasis de las células B y T que produce el compuesto del apartado (b) en células control.
22. Uso de una secuencia nucleotídica, que comprende una mutación insercional, que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia que codifica para SEQ ID NO: 1, o con SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia nucleotídica está inactivada, como diana, en una célula de mamífero no humano aislada, para el screening de compuestos con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T.
- 45 23. Uso según la reivindicación 22 donde las células de mamífero son de ratón.
- 46 24. Compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T obtenido por el método según la reivindicación 21, donde dicho compuesto es una secuencia nucleotídica que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que codifica para un siRNA de una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que es SEQ ID NO: 1.
- 50 25. Vector de expresión que comprende el compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T según la reivindicación 24.
- 55 26. Célula modificada genéticamente, aislada de un mamífero no humano, transfectada con el vector según la reivindicación 25.
- 56 27. Compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T según la reivindicación 24, o del vector según la reivindicación 25 para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer hematopoyético.
- 60 28. Compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T según la reivindicación 27, donde el cáncer hematopoyético es un linfoma.
- 65 29. Uso del compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T según la reivindicación 24, o del vector según la reivindicación 25 para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento o prevención de un cáncer hematopoyético.
- 70 30. Uso del compuesto con capacidad moduladora de la homeostasis de células B y/o células T según la reivindicación 29, donde el cáncer hematopoyético es un linfoma.

ES 2 351 646 B1

31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 ó 30, donde el medicamento incluye al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde el medicamento incluye al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

25

30

35

40

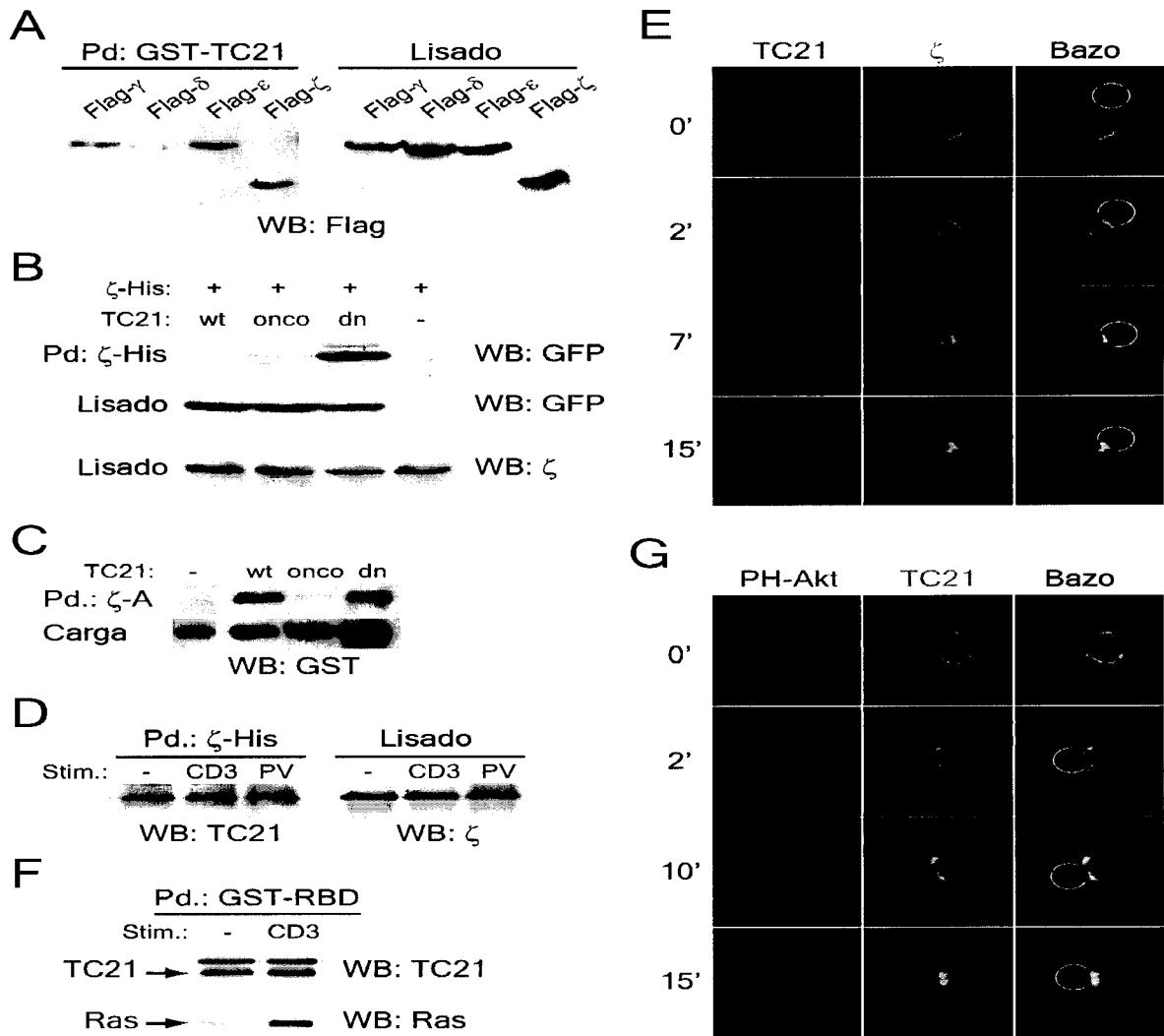
45

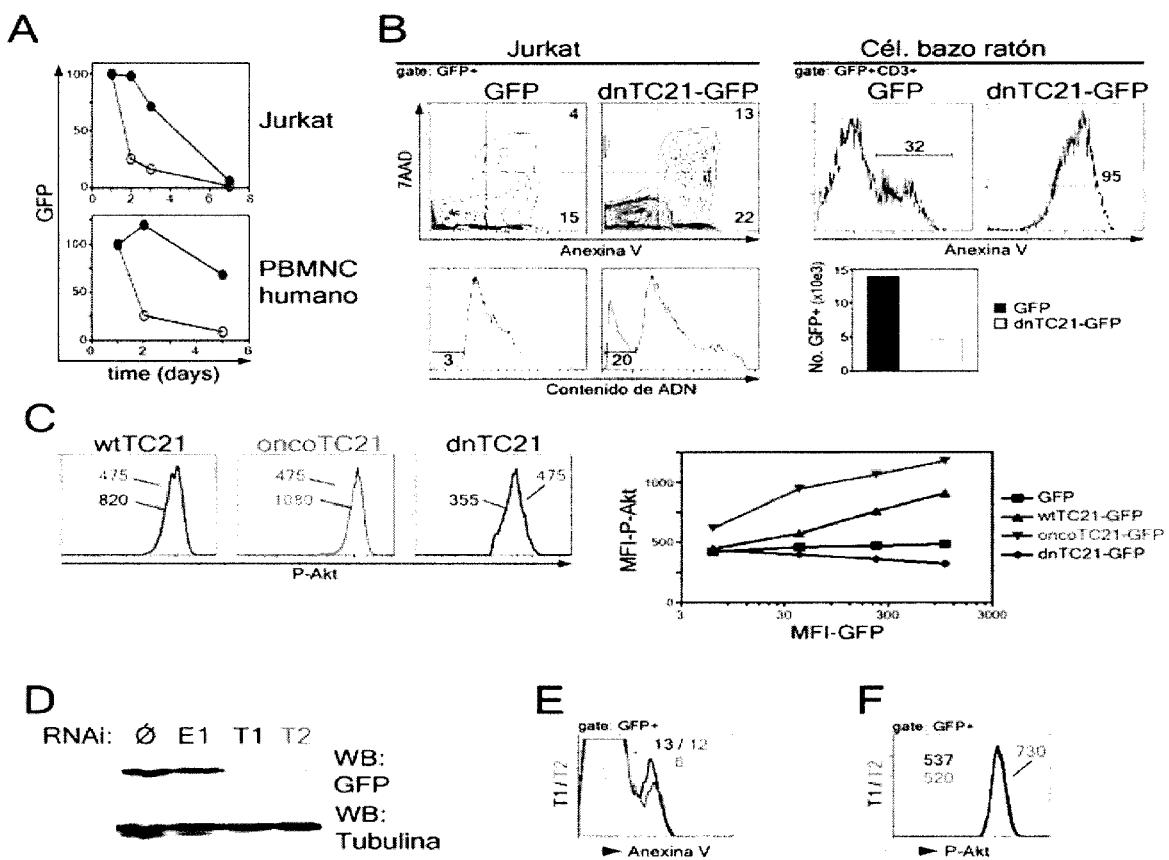
50

55

60

65

**FIG. 1**

**FIG. 2**

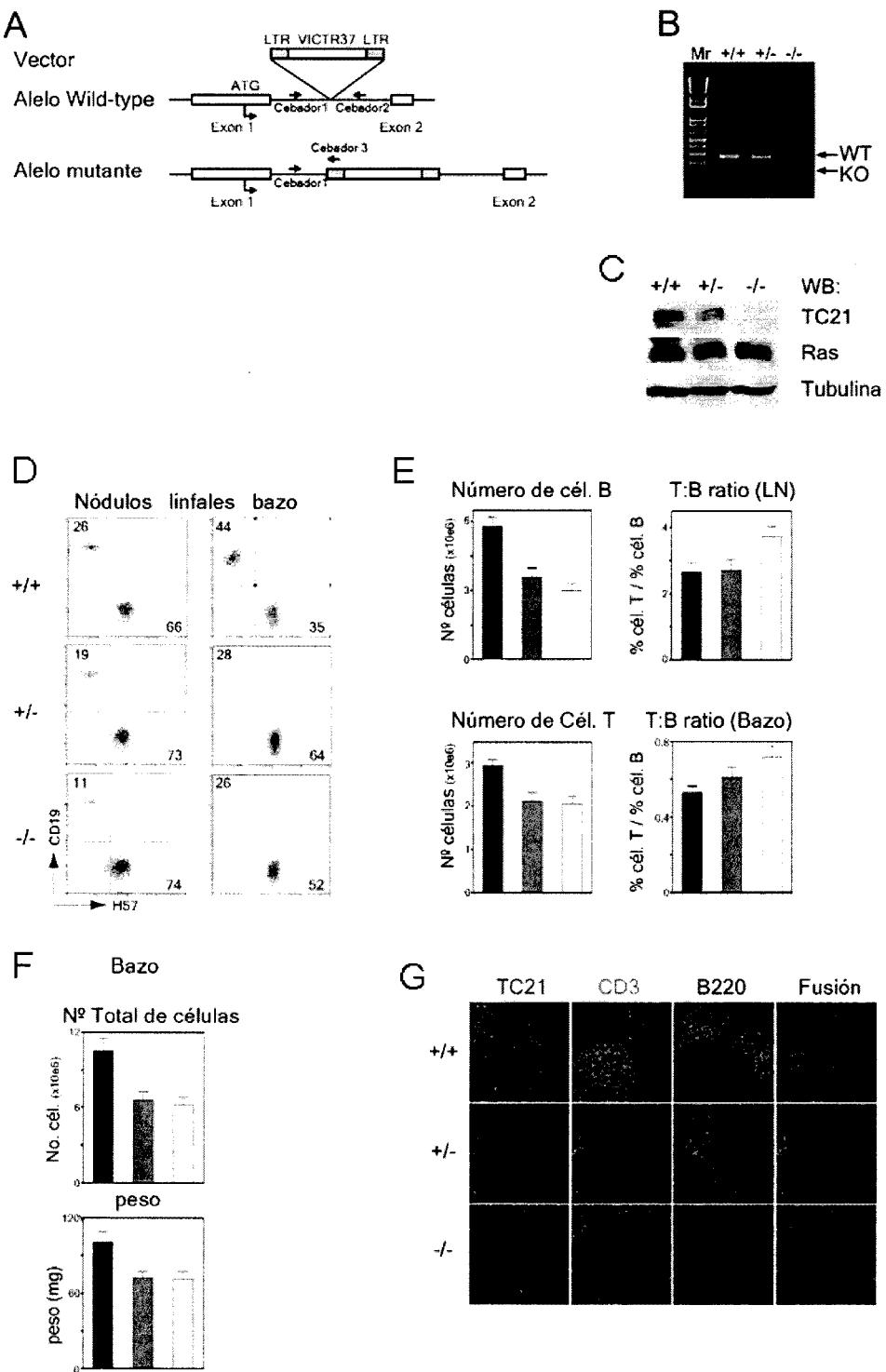
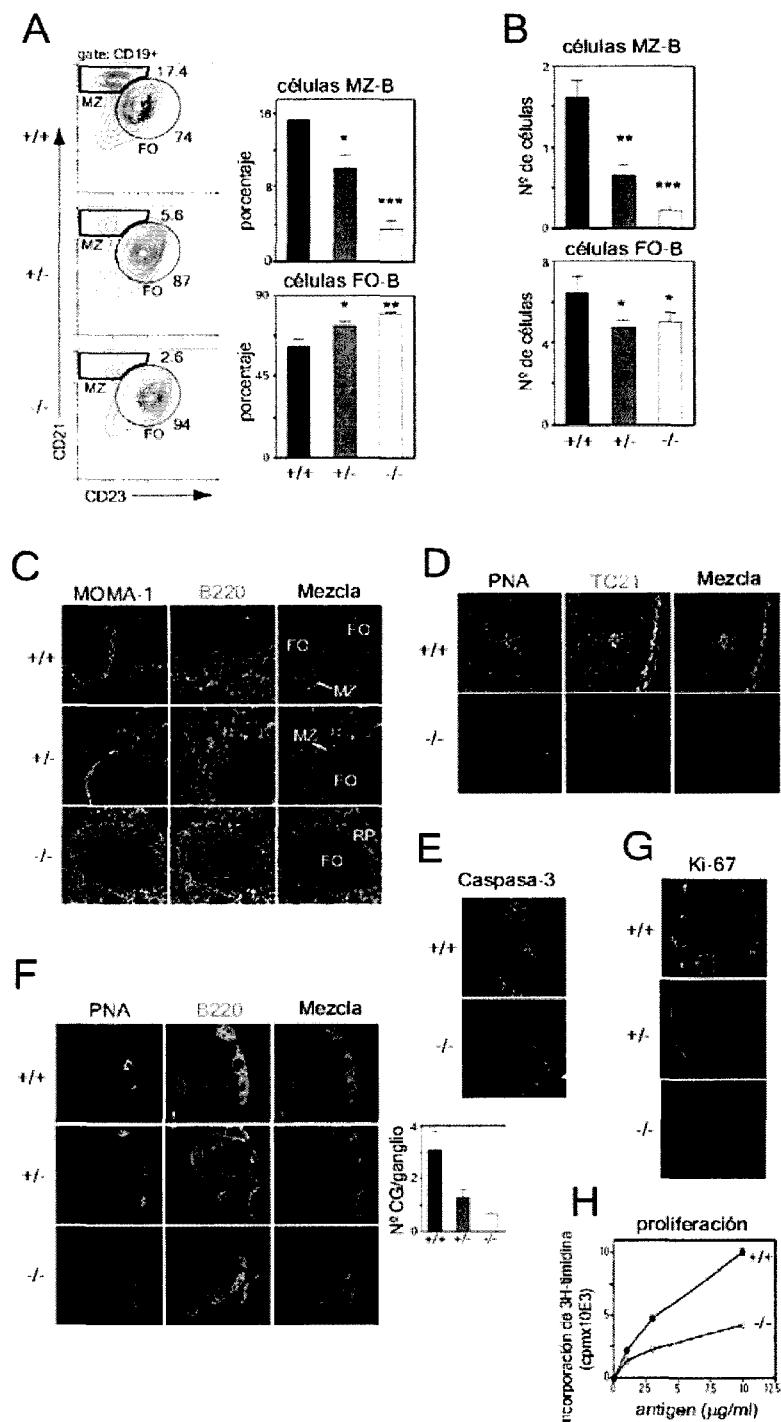
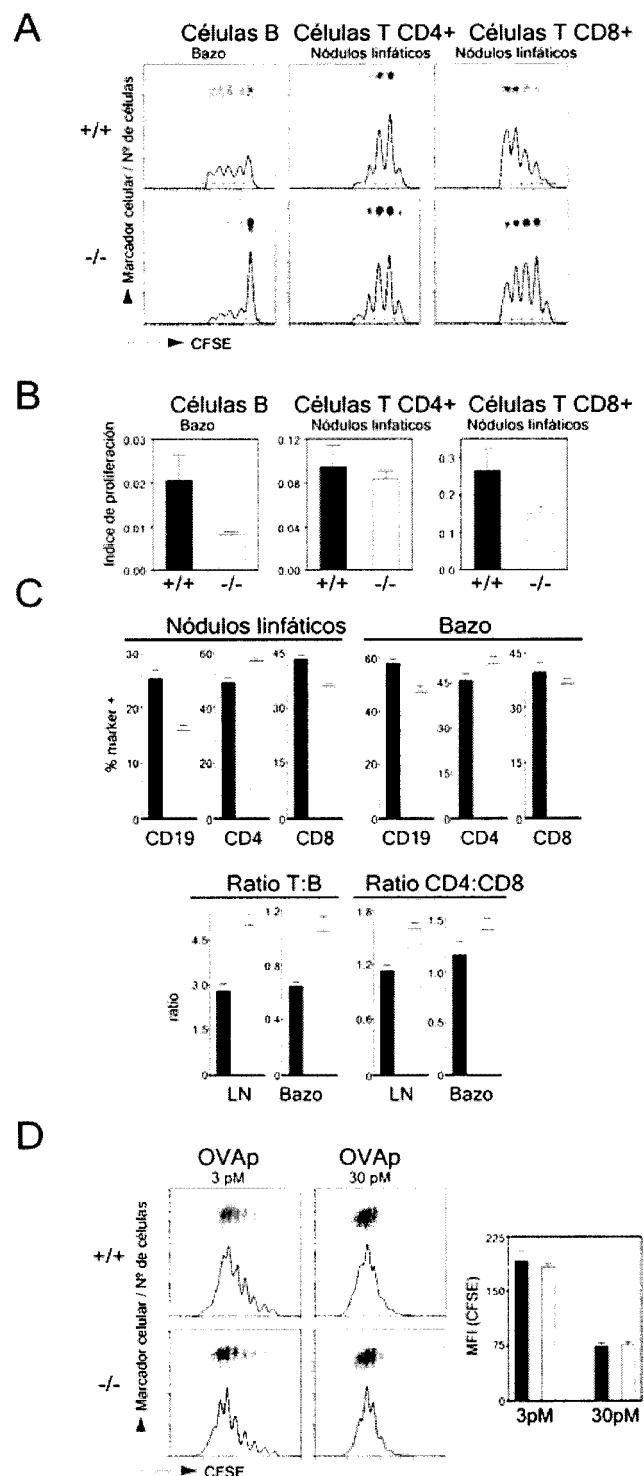


FIG. 3

**FIG. 4**

**FIG. 5**

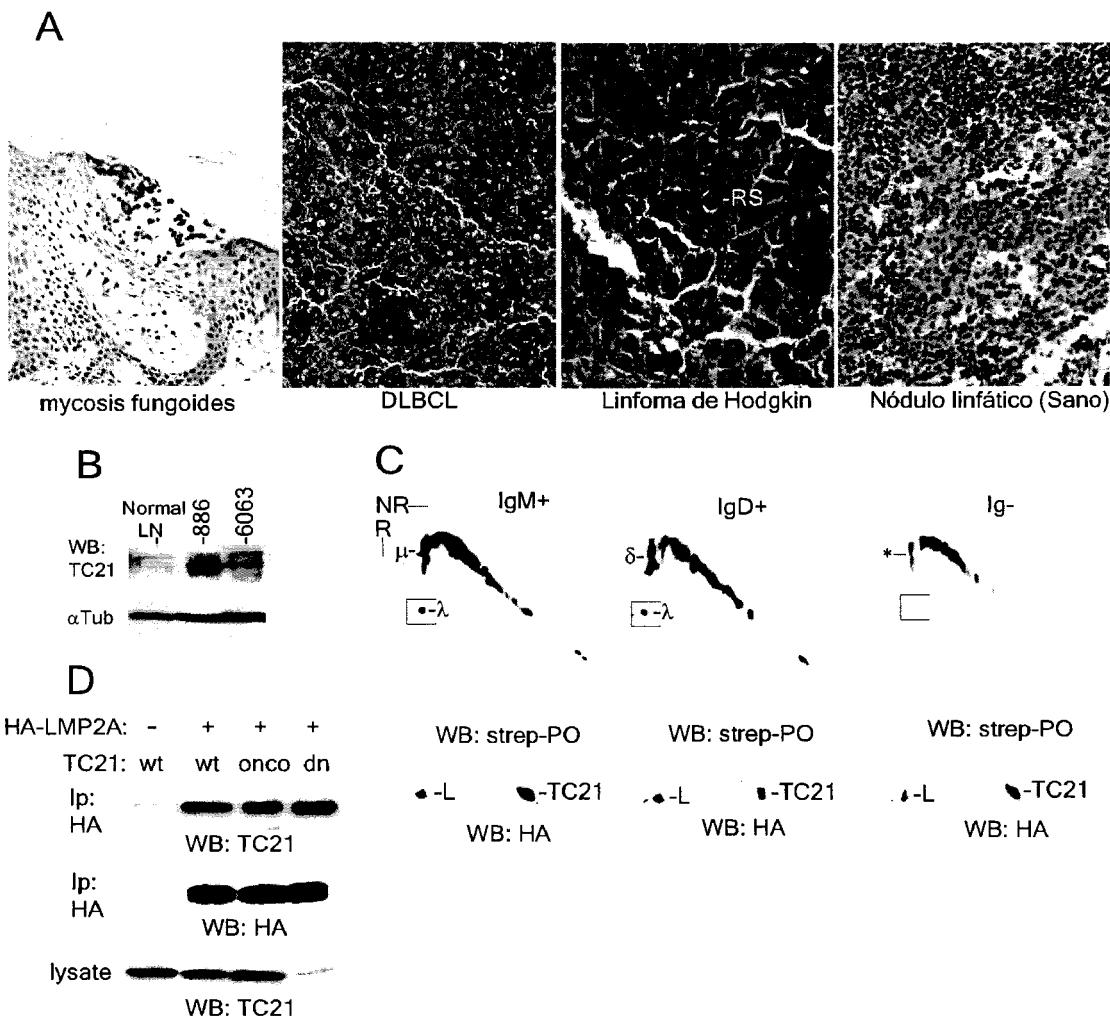


FIG. 6

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Mamífero no humano modificado genéticamente, células y métodos para producirlas

<130> 1641.392

10 <160> 7

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 615

<212> DNA

20 <213> *Mus musculus*

<400> 1

25	atggccgcgg ccggctggcg cgacggctcc ggccaggaga agtaccggct cgtggtggtc	60
	ggcggtggcg gcgtgggcaa gtcggcgctc accatccagt tcatccagtc ctattttgtg	120
30	acggactatg atccaaccat tgaagactca tacacaaagc aatgtgtgat cgatgaccga	180
	gctgccccgc tggacatttt ggatacagcc ggacaagagg agtttggagc catgagagag	240
	caatacatga ggacaggcga gggcttcctg ttggtcttct cagtcacgga tagaggcagt	300
35	tttgaagaaa tctataagtt tcaaagacag attctcagag taaaggaccg tgatgagttt	360
	cccatgattt taattggcaa taaagctgac ctggaccatc agagacaggt aacacaggaa	420
40	gaagggcagc agttagcaag gcagctcaag gtcacatata tggaggcattc ggcaaagatc	480
	aggatgaatg tagaccaagc tttccacgaa cttgtccggg ttataaggaa atttcaagag	540
	caagaatgcc ctcccttacc agaaccaacc cggaaagaaa aagacaagaa aggctgccat	600
45	tgtgtcattt tctaa	615
50	<210> 2	
	<211> 615	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55		
60		
65		

ES 2 351 646 B1

	<400> 2	
5	atggccgcgg ccggctggcg ggacggctcc ggccaggaga agtaccggct cgtggtggtc ggcgggggcg gcgtggcaa gtcggcgctc accatccagt tcatccagtc ctattttgta	60 120
10	acggattatg atccaaccat tgaagattct tacacaaagc agtgtgtgat agatgacaga gcagccccgc tagatatttt ggatacagca ggacaagaag agtttggagc catgagagaa	180 240
15	cagtatatga ggactggcga aggcttcctg ttggtctttt cagtcacaga tagaggcagt tttgaagaaa tctataagtt tcaaagacag attctcagag taaaggatcg tcatgagttc ccaatgattt taattggtaa taaagcagat ctggatcatc aaagacaggt aacacaggaa	300 360 420
20	gaaggacaac agttagcacg gcagcttaag gtaacataca tggaggcatc agcaaagatt aggatgaatg tagatcaagc tttccatgaa cttgtccggg ttatcaggaa atttcaagag caggaatgtc ctccttcacc agaaccaaca cggaaagaaa aagacaagaa aggctgccat	480 540 600
	tgtgtcattt tctag	615
25		
	<210> 3	
	<211> 19	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
35	ccattgaaga ttcttacac	19
	<210> 4	
40	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 4	
	tttcaagagc aggaatgtc	19
50	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
55	<400> 5	
	tgaaacagga tcatgttgtg gag	23
60	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
65	<213> <i>Mus musculus</i>	

ES 2 351 646 B1

<400> 6

caggaggagt ccaagaagac 20

5 <210> 7

<211> 23

<212> DNA

10 <213> *Mus musculus*

<400> 7

15 ataaaccctc ttgcagttgc atc 23

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

②1 N.º solicitud: 200930251

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2009

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZAMBROWICZ B.P. et al., "Wnk1 kinase deficiencylower blood pressure in mice: A gen-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention". PNAS (2003), vol. 100, nº 24, pág. 14109-14114 & DATABASE EMBL [online] 08 oct 2003 [recuperado el 24 sep. 2010] Recuperado de EBI, Nº de acceso CG36518, todo el documento.	1-2,4-11,13,15-20
A	WO 9532223 A1 (US HEALTH) 30.11.1995, todo el documento.	1-32
A	SEDDON B. et al., "Regulation of peripheral T-cell homeostasis by receptor signaling". Curr. Op. Immunol. (2003), 15, pág. 321-324, todo el documento.	1-32
A	OKKENHAUG K. et al., "Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI3- kinase mutant mice". Science (2002), 297, pág. 1031-1034, todo el documento.	1-32

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 26.01.2011	Examinador M. Hernandez Cuellar	Página 1/4
--	------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/0735 (01.01.2010)

C12N15/12 (01.01.2006)

A01K67/027 (01.01.2006)

C12Q1/68 (01.01.2006)

A61K31/7105 (01.01.2006)

A61P7/00 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01K, C12Q, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,EBI SEQUENCES DATABASES,REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3, 10-12, 14-32 Reivindicaciones 1-2, 4-9, 13	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3, 12, 14, 21-32 Reivindicaciones 1-2, 4-11, 13, 15-20	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZAMBROWICZ B.P. et al., "Wnk1 kinase deficiencylower blood pressure in mice: A gen-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention". PNAS (2003), vol. 100, nº 24, pág. 14109-14114. & DATABASE EMBL [online] 08 oct 2003 [recuperado el 24 sep. 2010] Recuperado de EBI, Nº de acceso CG36518, todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente solicitud se refiere al gen R-Ras2 , a su producto de expresión, la proteína TC21, y a implicación en la supervivencia y homeostasis de las células T y B. La invención tiene por objeto, una célula aislada, procedente de un mamífero no humano, modificada genéticamente en la que el gen R-Ras2 de *Mus musculus* se encuentra inactivado funcionalmente. En particular la reivindicación 3 se refiere a una célula en la que el producto de expresión está inactivado por un siRNA codificado por las secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. La invención también tiene por objeto un mamífero no humano modificado genéticamente que contiene dichas células, así como los métodos para producir tanto los animales como las propias células y al uso de estas células y métodos que las comprenden para el cribado y selección de compuestos con capacidad moduladora de la supervivencia y homeostasis de las células T y B. Por otra parte, y en relación con estos compuestos, la invención tiene por objeto una secuencia nucleotídica capaz de generar un siRNA para la silenciación post-transcripcional del producto de expresión del mencionado gen R-Ras2 que se particulariza en la secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

El documento D01 se refiere a la identificación a nivel genético de la función de los genes. Los autores han desarrollado mediante el método de captura génica una biblioteca de más de 270,000 células madre embrionarias de ratón que comprenden mutaciones en aproximadamente el 60% de los genes de mamíferos. Según D01 la captura génica es un método de mutación al azar en el cual la inserción de un elemento de DNA en genes endógenos provoca la disrupción transcripcional en dichos genes. Este método permite mutar miles de genes individuales con un solo vector insertional, o de captura génica así como producir de forma eficiente marcadores de secuencia para la identificación rápida de los alelos alterados. En este documento se analiza la biblioteca de células madre generadas mediante la captura génica con respecto a la eficiencia de la identificación de los genes, la cobertura de los genes, la identificación de las mutaciones y la propia mutagenicidad. Como ejemplo de su estudio, los autores han describen la obtención y análisis de ratones que portan una mutación en el locus Wnk1.

D01 es el documento fuente de la referencia con Nº de acceso CG636518 de la base de datos EMBL en la que se incluye el clon OST361011, que han utilizado los solicitantes para generar los ratones deficientes en TC21. El clon OST361011 forma parte de la biblioteca de clones de ratón descrita en D01 y se caracteriza por presentar una inserción retrovírica VICTR37 en mitad del intrón 1 que inactiva el gen R-Ras2.

Por otra parte, esta referencia también aporta la secuencia del mRNA correspondiente generado a partir del clon OST361011.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

El clon descrito en D01 describe la célula objeto de las reivindicaciones 1-2, 4-9 y su método de obtención correspondiente a la reivindicación 13 y por tanto, en opinión de esta Oficina, las mencionadas reivindicaciones no cumplen el requisito de novedad.

Por otra parte, esta Oficina considera, que la reivindicación 3 relativa a la célula aislada cuyo producto de expresión está inactivado mediante un siRNA codificado por SEQ ID NO 3 O SEQ ID NO 4 cumple el requisito de novedad y actividad inventiva. La misma consideración positiva con respecto a la novedad y a la actividad inventiva se extiende a las reivindicaciones 12, 14, 21-32.

En cuanto a la actividad inventiva de las reivindicaciones relativas al mamífero no humano modificado genéticamente que contiene la célula en la que el gen R-Ras2 está inactivado funcionalmente, esta Oficina considera ,que dado el estado del arte actual relativo a la obtención de animales transgénicos, en particular knockout, los solicitantes partiendo del clon OST361011 obtendrían el ratón transgénico correspondiente con unas expectativas razonables de éxito aplicando técnicas habituales y rutinarias pertenecientes a esta tecnología de forma análoga al descrito en el propio documento D01 para el locus Wnk1 partiendo de un clon de la misma biblioteca. En este sentido, en opinión de esta Oficina las reivindicaciones 10-11 y 15-20 no cumplen con el requisito de actividad inventiva.