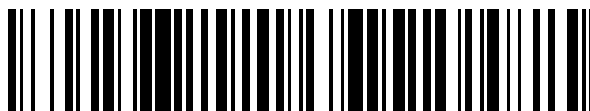


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 700**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008** **E 08852004 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013** **EP 2217622**

54 Título: **Procedimiento para la separación de células**

30 Prioridad:

20.11.2007 EP 07022478

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

08.11.2013

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
FRIEDRICH-EBERT-STRASSE 68
51429 BERGISCH GLADBACH, DE**

72 Inventor/es:

BOSIO, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 428 700 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la separación de células.

- 5 La presente invención se refiere a una célula que contiene un gen que no está presente en esta forma en un tipo natural de célula, y que codifica un marcador de superficie transgénico condicional que es detectable durante la expresión del marcador en la superficie celular. Además, la invención se refiere a un constructo para generar este tipo de célula y a un procedimiento para la separación de esta célula de una población celular.

10 Antecedentes de la invención

La separación y el aislamiento de tipos de célula específicos en el contexto de organismos completos permite su cultivo por separado y el análisis molecular así como funcional. Esto ha resultado ser muy útil para la comprensión de las poblaciones de células específicas y de su interacción con otras células pero también para su manipulación y su uso terapéutico.

Se han formulado muchos procedimientos para analizar y clasificar las poblaciones celulares, que incluyen de manera no limitativa procedimientos que utilizan el tamaño, la densidad o la granulidad de una célula para una separación mediante sedimentación que se puede realizar por sí misma o en combinación con gradientes de densidad y centrifugación o elutriación. Otros procedimientos se basan en las diferencias de resistencia de las células a la lisis osmótica para la separación de, por ejemplo, los leucocitos de la sangre. Además, se pueden utilizar los procedimientos de depleción de células no deseadas utilizando anticuerpos tóxicos específicos con un marcador de superficie celular. Otros procedimientos incluyen, por ejemplo, la citometría de flujo o la separación magnética de células (por ejemplo, utilizando anticuerpos conjugados con microesferas magnéticas, por ejemplo, MACS, Miltenyi Biotec) y otros procedimientos que dependen de la afinidad del anticuerpo a moléculas de superficie específicas como las proteínas. Utilizando estas últimas técnicas, se puede conseguir un enriquecimiento positivo o depleción de las células que expresan una molécula en concreto que incluye de manera no limitativa ARN, ADN, lípido, azúcar o proteína.

Se ha descrito que una proteína verde fluorescente (GFP) expresada de forma recombinante se puede colocar en la cara citosólica de la membrana plasmática de las células madre embrionarias de ratones gracias a un sitio de palmitoilación que está presente en la GFP recombinante. Se ha especulado que las células que expresan estas proteínas GFP se pueden separar de las células que no expresan esta GFP recombinante utilizando el separador de células activadas por fluorescencia (FACS) (Schindehütte et. al. (2005) Stem Cells 23:10-15).

Tanto en la citometría de flujo como en la separación magnética de células, el marcador de la proteína se etiqueta a través de un anticuerpo específico que a su vez está unido directa o indirectamente a un colorante fluorescente o a una partícula superparamagnética (microesfera). Se pueden utilizar tanto los marcadores intracelulares como los extracelulares. Sin embargo, cuando se necesita obtener células vivas, entonces sólo se pueden utilizar marcadores extracelulares ya que la célula ha de estar fijada y permeabilizada para la tinción intracelular.

Por consiguiente, hasta ahora sólo estos tipos de células no transgénicas eran accesibles para una separación magnética de células, y la citometría de flujo de células vivas en el contexto de un organismo completo en el que los marcadores de superficie eran conocidos y específicos, y en el que estaban disponibles anticuerpos de alta afinidad (Recktenwald and Radbruch, Cell Separation Methods and Applications (1998), 153-174).

Tal como se ha indicado, muchos tipos adicionales de células se caracterizan mediante los marcadores intracelulares como las proteínas citoesqueléticas, los factores de transcripción, proteínas específicas de orgánulos, enzimas, etc. (Berhuis et al. (2004) Int. J Dev Neurosci 22:533-43).

Entre otros, estos marcadores intracelulares se han utilizado para generar líneas de ratones que expresan un indicador específico del tipo de célula utilizando el promotor respectivo (Suzuki et al. (2003) Neurosci. Res. 47:451-454; Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236; Zambrowicz et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3789-94; David et al. (2005) Stem Cells 23:477-482).

Además, algunos tipos de célula se caracterizan además o solamente por parámetros espacio-temporales. Esto quiere decir que estas células no se caracterizan, o no sólo se caracterizan por la expresión del marcador sino por su aparición limitada durante un cierto periodo de tiempo. Por ejemplo, las células presentes sólo en la amígdala del cerebro, las células que tienen alguna función sólo durante el periodo posnatal temprano, células que tienen alguna función después de la lesión de un órgano, o células que cambian su comportamiento después de un tratamiento con fármacos.

Sin embargo, el indicador utilizado en combinación con marcadores intracelulares o con propiedades espacio-temporales hasta ahora son o bien indicadores de fluorescencia (como la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína fluorescente amarilla (YFP), etc.) u otros indicadores que se pueden utilizar para teñir una célula (por ejemplo, la beta galactosidasa). En algunos casos, se han introducido transgénicos que permiten una depleción de

una línea celular específica mediante la expresión del receptor de la toxina de la difteria (DTR) (Buch et al. (2005) Nature Methods 2:419-426) o directamente la subunidad A de la toxina de la difteria (DT-A) (Palmiter et al. (1987) Cell 50:435-443; Breitman et al. (1987) Science 238:1563-1565).

- 5 Finalmente, también se ha informado de que bajo ciertas condiciones y para algunos marcadores puede ser posible degradar parcialmente la superficie de una célula para acceder a los marcadores intracelulares pero manteniendo la célula viva (Berghuis et al. (2004) Int J Dev Neurosci 22:533-43).

10 En el caso de la separación por flujo, los indicadores fluorescentes se pueden utilizar para el aislamiento de células vivas. Aunque se han desarrollado instrumentos para la separación por citometría de flujo a alta velocidad que permiten la separación de algunas decenas de miles de células por segundo, sería un gran adelanto si se pudieran utilizar técnicas como la de separación magnética de células para el aislamiento de células o de entidades biológicas derivadas de éstas, caracterizadas por un marcador intracelular o con propiedades espacio-temporales. La separación inmunomagnética de células, por ejemplo, MACS Cell Separation System, permite separar varios miles de millones de células en pocos minutos, es mucho menos incómoda y con un coste mucho más eficaz que la citometría de flujo, ya que no son necesarios instrumentos complejos ni personal experto.

20 Para las líneas celulares y las células primarias que están cultivadas *in vivo*, se ha informado de varios procedimientos para la introducción de un marcador celular de superficie transgénico para posteriormente separar estas células utilizando la citometría de flujo o separación magnética de células (Gaines et al. (1999) Biotechniques 26:683-688). En resumen, las células se transfectan con un constructo que conduce a la expresión de un marcador de superficie que puede ser dirigido a su vez por un anticuerpo específico que transporta una etiqueta fluorescente o una microesfera superparamagnética. Este enfoque se puede extender también a la expresión de un marcador transgénico de superficie celular en las células de un organismo completo utilizando los procedimientos de transfección adecuados como vectores virales, inyección pronuclear o enfoques dirigidos al gen (Yasunaga et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1542-1550).

30 Sin embargo, un experto en la materia, no puede predecir si un organismo completo transgénico o transfectado va a expresar un indicador de la forma que se desea. Los transgénicos exógenos pueden no alojar todas las secuencias necesarias y suficientes para una regulación adecuada de la transcripción y puede por consiguiente recibir la influencia por, por ejemplo, de elementos cis-reguladores próximos al lugar de la inserción (Banares et al. (2005) Genesis 42:6-16). Por consiguiente, la generación y la caracterización de por ejemplo, un ratón transgénico adecuado todavía resulta incómoda y requiere demasiado tiempo.

35 Por lo que se refiere a la naturaleza de los marcadores de superficie transgénicos, se han descrito en la bibliografía varias posibilidades distintas (ver anteriormente, por ejemplo, CD4, LNGFR, H2Kk, DTR). La mayoría de estos marcadores son proteínas que aparecen de forma natural que se expresan ectópicamente para indicar el estado transgénico de una célula. Algunas de estas proteínas como la CD4 y la LNGFR además se han diseñado para que presenten un dominio intracelular eliminado o mutado para evitar la señal sobre el anticuerpo unido al dominio extracelular. Sin embargo, ninguna de las proteínas mencionadas en la bibliografía es adecuada para ser utilizada en una separación celular y en experimentos secuencia abajo que cubren diferentes fuentes de tejido, tipos celulares y protocolos para la aplicación en células separadas o en la separación de células. Algunas de estas proteínas, como la CD4, no son resistentes a la tripsina o a la papaína y por consiguiente no se pueden usar en protocolos en los que las células se singularizan a partir de tejidos sólidos antes de la separación. Otras proteínas son proteínas de transmembrana múltiple y por consiguiente no expresan parcialmente de forma adecuada como un transgénico. También, las proteínas pueden ser tóxicas o presentan por lo menos un impacto no deseado sobre las células vecinas cuando se expresan ectópicamente en la superficie celular de por lo menos algunos tipos de células. por último, algunas proteínas como la DTR, se internalizan tras la reacción del anticuerpo.

50 Además, cuando las células ya se han aislado, frecuentemente se caracterizan funcionalmente injertándolas en organismos receptores. Por ejemplo, el potencial neurogénico de los precursores neuronales se evalúa colocándolos en diferentes áreas del cerebro (Seidenpfaden et al. (2006) Mol. Cell. Neurosci. 32:187). Comparativamente, los enfoques que se encaminan hacia la medicina regenerativa aspiran a probar diferentes tipos de células y agregados derivados de ellos debido a su capacidad de repoblación en modelos de organismos y en pacientes. El rechazo de células donantes se puede evitar generalmente realizando trasplantes autólogos o utilizando cepas endogámicas en el caso de la investigación preclínica. Pero lo más probable es que los epítomos de superficie transgénicos convencionales desencadenen una respuesta inmunológica y finalmente el rechazo de las células si el receptor no está inmunodeprimido o si el epítipo transgénico no es idéntico a un epítipo expresado endógenamente. Éste último no permitiría distinguir entre las células injertadas y las células huésped por parte del epítipo de superficie transgénico después del injerto. Tal como se explicará a continuación, esto sorprendentemente se consigue mediante los recursos de la presente invención.

Descripción de la invención

65 En consecuencia, el problema subyacente en la presente invención fue el de proporcionar los recursos para la separación de una célula viva en particular de una población de células vivas, en los que también se puede utilizar

un marcador celular intracelular.

Este problema se resuelve proporcionando un gen y una célula que contiene dicho gen que codifica un marcador de superficie transgénico condicional que es detectable durante la expresión en la superficie celular sin la necesidad de romper la membrana celular o destruir la integridad de la célula. El gen que codifica un marcador de superficie transgénico condicional comprende:

- (i) Un promotor para dirigir la transcripción de una primera secuencia de transcripción, enlazado funcionalmente a
- (ii) una primera secuencia de transcripción, también denominada ADN STOP en la presente memoria, y
- (iii) una segunda secuencia de transcripción que codifica para el marcador de superficie (indicador),

en el que la primera secuencia de transcripción (el ADN STOP) evita la transcripción de la segunda secuencia, y también es extraíble condicionalmente de forma que la segunda secuencia de transcripción se puede transcribir para producir una célula transgénica que expresa el marcador de superficie transgénico condicional. Además, el marcador de superficie es de una clase que torna la célula clasificable a través de la detección de este marcador de superficie.

La segunda secuencia de transcripción que codifica para el marcador de superficie, comprende

- (a) opcionalmente, una primera secuencia de etiqueta para la unión específicamente a un anticuerpo posicionado en la cara citosólica de la membrana plasmática de una célula, o
- (b) un dominio de asociación de transmembrana o membrana para posicionar o anclar el marcador de superficie en la membrana celular, de forma que el marcador de superficie se pueda detectar desde el lado extracelular; y
- (c) una segunda secuencia de etiqueta para hacer que la célula se separe, especialmente mediante la unión específica en el lado extracelular de una célula o un anticuerpo.

La primera secuencia de etiqueta o el dominio de asociación de membrana o transmembrana puede, en una forma de realización, por lo menos parcialmente solaparse con la segunda secuencia de etiqueta.

Puesto que el marcador de superficie celular es una proteína con por lo menos un dominio de asociación membrana y/o transmembrana (como un ancla GPI) se posiciona, por consiguiente, en la membrana celular de forma que por lo menos una parte de la proteína esté en la parte extracelular de la célula, tornándola detectable con, por ejemplo, un anticuerpo. De esta forma, deviene clasificable.

Resulta particularmente preferible que el marcador de superficie cumpla por lo menos uno de los siguientes requisitos: el marcador de superficie debería ser resistente a la digestión con tripsina, o con papaína, y no debería ser internalizado por la célula durante la unión de un anticuerpo al superficie celular. Es preferible que el marcador de superficie (clasificable) cumpla todos los requisitos mencionados anteriormente.

El marcador de superficie es una proteína que no se expresa de esta forma en una célula de tipo salvaje, es decir, una célula que no contiene la secuencia del marcador de superficie transgénico condicional. En una forma de realización preferida de la invención, el marcador de superficie es una proteína que se expresa ectópicamente. Este tipo de marcador de superficie puede derivar, por ejemplo, de una proteína que se expresa endógenamente en un tipo de célula salvaje, como a partir de una proteína celular (como una proteína citoplasmática o nuclear) o a partir de una proteína de la membrana nuclear. En otra forma de realización preferida de la invención, el marcador de superficie es una proteína que se expresa como una proteína unida a la membrana o asociada a la membrana en una célula de tipo salvaje. En este caso, esta versión modificada de una proteína de membrana expresada endógenamente no cumple la misma función que la proteína expresada endógenamente, para permitir la distinción entre la proteína expresada endógenamente y el marcador de superficie. Además, esta proteína de membrana expresada endógenamente se diferencia en la parte extracelular de la proteína de su forma de tipo salvaje para hacer que sea distinguible para clasificar la célula. La modificación de la proteína expresada endógenamente se puede conseguir, por ejemplo, insertando o eliminando por lo menos un aminoácido para generar un dominio de asociación transmembrana o membrana, mutando un dominio de unión, el centro activo y/o un dominio de reconocimiento extracelular.

Preferentemente, el marcador de superficie comprende o está compuesto de una primera secuencia de etiqueta (TAG1) para el posicionamiento intracelular, unida a un dominio de transmembrana TM seguida de una segunda secuencia de etiqueta (TAG2) para el posicionamiento extracelular (en la dirección desde N- a C- terminal). La secuencia TAG2 es preferentemente resistente a las proteasas utilizadas generalmente para la separación de tejidos, como tripsina, papaína, liberasa, dispasa y/o colagenasa. Es preferible además que TAG1 y TAG2 se unan a

su respectivo anticuerpo ambos en su configuración natural así como en su configuración desnaturalizada. TAG 1 y TAG2 son preferentemente no tóxicos. TAG2 puede estar compuesto, por ejemplo, tanto del dominio extracelular completo de CD271, CD4, H2Kk, CD2, CD14, CD90, CD45 o CD133 como de partes de él. Estas partes presentan una longitud de entre 5 y 50, preferentemente entre 10 y 40, y más preferentemente entre 15 y 30 o 20 y 25 aminoácidos. Estos dominios extracelulares y sus partes también pueden ser proteínas y péptidos que sean por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% homólogos a los dominios extracelulares y péptidos citados anteriormente. Los dominios extracelulares de las proteínas indicadas anteriormente son conocidos por los expertos en la materia o se pueden recuperar de una base de datos apropiada.

En una forma de realización preferida, TAG2 comprende, o está compuesto de, el bucle extracelular 1 de CD133 (SEC ID nº 2) y/o el bucle extracelular 2 de CD133 (SEC ID nº 3) o partes suyas (Miraglia et al. (1997) Blood, 90: 5013), incluyendo las secuencias que son por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% homólogos a él.

Secuencia del CD133 (SEC ID nº 1):

MALVLGSLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVH
IFLYVYVQPRDFPEDTLRKFLQKAYESKIDYDKPETVILGLKIVYYEAGIHLCCVLGLLFIIL
MPLVGYYFFCMCRCCNKCGGEMHQKQKENGPFRLKCFASILLVICIIISIGIFYGFVANHQV
RTRIKRSRKLADSNFKDLRTLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDR
LRPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKSLLHQSTQLSSSLTSVKTSLSRSSLNDPL
CLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPRLQPPVDAELDNVNNVLRDLDGLVQQGYQSLND
IPDRVQRQTITTVVAGIKRVLNSIGSDIDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNNTESIYHRNLPTLE
EYDSYWWLGGVLCSLLTLIVIFYLGLLCGVCYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVG
GLSFLFCWILMIIVLTFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYYSGLKLFN
KSKMKLTFEQVYSDCKKNRGTGYTLHLQNSFNISEHLNINEHTGSISSELESKVNINIFL
LGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDSYLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLR
NSLKRDAQTIKTIHQQRVLPQEQSLSTLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFANFITN
NTSSVIEETKKYGRTIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKPVATALDTAVDVFLCSYIIDPLN
LFWFGIGKATVFLPALIFAVKLAKYYRRMDSVDYDDVETIPMKNMENGNGYHKDH
VYGIHNPVMTSPSQH

Secuencia del bucle (extracelular) 1 de CD133 (SEC ID nº 2):

NHQVRTRIKRSRKLADSNFKDLRTLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGG
GILDRLRPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKSLLHQSTQLSSSLTSVKTSLSRSS
LNDPLCLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPRLQPPVDAELDNVNNVLRDLDGLVQQGY
QSLNDIPDRVQRQTITTVVAGIKRVLNSIGSDIDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNNTESIYHRN
LPTLEEYDSYWW

Secuencia del bucle (extracelular) 2 de CD133 (SEC ID nº 3):

TFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYYSGLKLFNFKSKMKLTFEQVYSD
CKKNRGTGYTLHLQNSFNISEHLNINEHTGSISSELESKVNINIFLLGAAGRKNLQDFAA
CGIDRMNYDSYLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQ
QRVLPQEQSLSTLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFANFITNNTSSVIEETKKYGR
TIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKPVATALDTAVDVFLCSYIIDPLN

en una forma de realización alternativa, TAG2 comprende, o está compuesto de, por lo menos en parte, una secuencia artificial que no es homóloga a ninguna secuencia de mamífero existente para evitar las interacciones no deseadas o la afinidad a un epítipo de superficie conocido:

NEGVYSDQ (SEC ID nº 4),
DQNSQDEE (SEC ID nº 5),
SDDQEQ (SEC ID nº 6),
DEYDHYVD (SEC ID nº 7), y/o
DFKDEDFKD (SEC ID nº 8).

Preferentemente, TAG2 no se internaliza en la célula durante la reacción del anticuerpo. Preferentemente, todas las secuencias de ADN proporcionadas se optimizan mediante un codón.

En otra forma de realización preferida, para evitar que se desencadene una respuesta inmunológica, se adhiere una secuencia de reconocimiento de la proteasa (PRS) adicional entre TM y TAG2. Esta PRS permite un desprendimiento del epítipo de superficie transgénico después de clasificar las células y antes de injertar las células en un receptor. La PRS está compuesta de tal forma que se rompe por una proteasa de secuencia específica que no está presente de forma natural en el espacio extracelular de los mamíferos. Un ejemplo de una proteasa adecuada es la proteinasa Nla del virus del grabado del tabaco (Lucast et al. (2001) *BioTechniques* 30:544). Esta proteasa reconoce una secuencia heptapéptida específica, E-X-X-Y-X-Q-S/G (SEC ID nº 9), que se adhiere entre Q y S/G y es activa bajo un amplio intervalo de condiciones y en presencia de varios inhibidores de la proteasa (X: cualquier aminoácido). El lugar de adhesión es compatible con la tripsina (que corta después de la lisina, la arginina y la cistinina modificada) y la papaína (que corta después de los aminoácidos básicos leucina y glicina), y es resistente a estas dos proteasas.

En consecuencia, el término "transgénico" se refiere a una proteína que no está presente en una célula de tipo salvaje. En vez de eso, se puede generar a través de una modificación genética, como en forma de una introducción de una transmembrana y/o un dominio de asociación de membrana.

El término "marcador de superficie" o "indicador" se utiliza en la presente memoria para referirse a un marcador de superficie celular externo o a un gen de un marcador de superficie celular externo y/o a su o sus fragmentos y/o a sus homólogos. El término "homólogo" se refiere a las secuencias (de ADN, ARN, y/o proteína) con por lo menos un 80% de homología, preferentemente por lo menos un 90%, más preferentemente por lo menos un 95% de homología a la secuencia proporcionada a que se hace referencia en la presente memoria con los nombres de su gen o proteína. Las secuencias a las que se hace referencia en la presente invención incluyen homólogos aunque no se mencionen con mayor detalle.

La primera secuencia de transcripción (ADN STOP) incluye, pero no se limita a, secuencias que señalizan la liberación del polipéptido naciente del ribosoma debido a la unión de factores de liberación en ausencia del cognado de ARNt con anticodones complementarios a estas señales de parada como los tres codones de parada habituales: UAG (ámbar), UGA (ópalo, a veces también denominado ocre oscuro), y UAA (ocreo) o uniones complejas de diferentes secuencias que conducen a un grado más elevado de terminación de transcripción, como "neostop" o "Westphal-Stop que consisten en partes de 3' del gen His3 de la levadura, la secuencia de poliadenilación SV40 y un codón de inicio de transcripción falso seguido de un sitio donador de empalme 5' (Lakso M., Sauer, B., Mosinger, B. J., Lee, E.J. Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. y Westphal, H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6232-6236).

Existen dos formas posibles para escindir la primera secuencia de transcripción para permitir la expresión del marcador de superficie, concretamente a través de una reacción no enzimática o a través de una reacción enzimática. Esto es posible, por ejemplo, a través del uso de nucleótidos modificados o etiquetados que se introducen en el ácido nucleico, que en el momento de la activación induce a roturas de la doble hélice en el ácido nucleico. Consecutivamente, la recombinación espontánea de la doble hélice inducida por la mediación del anticuerpo y la proximidad conduce a la escisión de la primera secuencia de transcripción (ADN STOP).

En una forma de realización preferida en la que la escisión se realiza de forma enzimática, la primera secuencia de transcripción (ADN STOP) está flanqueada a ambos lados por un sitio de reconocimiento de la recombinasa (RRS). Para la extracción condicional de la primera secuencia de transcripción del gen, se necesita una recombinasa que reconozca específicamente el RRS y cree una escisión en la primera secuencia de transcripción de forma que se genere el marcador de superficie. La expresión de la recombinasa puede ser constitutiva o inducible. Es preferible que los RRS sean específicos para una recombinasa CRE o para una recombinasa FLP.

El término "recombinasa" se utiliza en la presente memoria para referirse a una enzima que cataliza la recombinación del ADN específico del sitio, específicamente reconociendo las RRSs.

La actividad de la recombinasa conduce (debido a la escisión del ADN STOP) a una célula en la que el gen que codifica para un marcador de superficie transgénico condicional comprende: un promotor, enlazado funcionalmente a una segunda secuencia de transcripción que codifica para un marcador de superficie adecuado para la clasificación de células. Por consiguiente, el resultado de la reacción de recombinación es una célula transgénica que expresa el marcador de superficie transgénico. Tal como se explicará a continuación, la acción enzimática de la recombinasa torna la célula clasificable en base al marcador de superficie expresado.

Es preferible que la segunda secuencia de transcripción sea una versión modificada del gen LNGFR humano, una versión modificada del gen humano CD4, H2Kk o CD133, en el que el término "modificado" se refiere a una proteína que se ha mutado o truncado en su parte intracelular para interrumpir su función de señalización.

En una forma de realización preferida, el marcador de superficie es el original o una versión modificada de CD271,

CD4, H2Kk, CD2, CD14, CD90, CD45, CD133, o su homólogo o una proteína que comprende por lo menos un dominio asociado de transmembrana y/o de membrana derivado de un gen transgénico. En otra forma de realización preferida, el marcador de superficie es una proteína que comprende por lo menos un dominio asociado de transmembrana y/o de membrana y que está situado en la membrana celular de tal forma que por lo menos una parte de la proteína está en la superficie celular y la proteína no se expresa endógenamente sino ectópicamente o es una versión modificada de una proteína que se expresa endógenamente en la que la versión modificada no cumple la misma función que la proteína expresada endógenamente.

El promotor puede ser un promotor heterólogo, un promotor ubicuo o de tejido específico, y/o un promotor constitutivo o inducible. Es preferible que el promotor sea el promotor de los genes siguientes: actina, hCMV, PGK, FABP, Lck, CamKII, CD19, queratina, albúmina, aP2, insulina, MCK, MyHC, WAP, Col2A, Mx, ROSA26, tet o Trex o una mezcla de múltiples promotores y elementos potenciadores como el promotor CAGGS. Es preferible que el promotor conduzca a una expresión sólida del marcador de superficie en todos los tipos de células, de forma que el número de moléculas de marcadores de superficie en la superficie celular sea suficiente para la detección y la clasificación.

Es preferible la utilización de un promotor inducible, especialmente cuando las células clasificadas se injertan en los receptores y es necesario evitar una respuesta inmunológica. Con este propósito, se elimina el epítipo de superficie transgénico antes del injerto utilizando una secuencia específica de proteasa que se adhiere al PRS (ver anteriormente) y no induciendo el promotor inducible se evita una reexpresión del epítipo de superficie.

También es posible que el promotor sea un promotor endógeno. De esta forma el marcador de superficie se expresa de la misma forma que el gen endógeno que está o estaba bajo el control de ese promotor en particular en la célula. Es preferible además que el promotor del marcador de superficie en la forma de una proteína endógena modificada sea idéntico al promotor que determina la expresión de esa proteína endógena. De esta forma el marcador se expresa de la misma forma que el gen endógeno del marcador de superficie del que se deriva. De esta forma la expresión del marcador de superficie sigue el mismo patrón espacio-temporal y específico celular que el de la expresión del gen endógeno correspondiente. Esto permite el estudio de la expresión celular específica y espacio-temporal de una proteína en la célula.

La célula también puede contener una recombinasa, que está determinada por un promotor inducible y/o el promotor del marcador específico de tipo celular endógeno.

La invención también se refiere a la utilización de una célula tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para clasificar células.

La invención también se refiere a un tejido, a un órgano o a un organismo no humano o a una línea de un organismo que contiene una célula como la descrita anteriormente en la presente memoria. Un organismo preferido es un mamífero, en especial un roedor, como un ratón, un conejo o una rata, o un cerdo, una res, una oveja, un perro, un gato o un mono. Un tejido u órgano preferido es también el de un humano.

Las células, las líneas celulares o los organismos transgénicos que expresan un marcador de superficie celular o un indicador se pueden utilizar después como entidades clasificables magnéticamente en cocultivos u otros organismos en el que son introducidas mediante, por ejemplo, procedimientos que comprenden el injerto, el trasplante, la inyección, la inoculación, y/o la administración.

El problema subyacente en la presente invención también se resuelve proporcionando un constructo, en especial un constructo recombinante para generar una célula transgénica como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Este constructo contiene un gen que codifica un marcador de superficie transgénico condicional que comprende:

(i) un promotor para dirigir la transcripción de una primera secuencia de transcripción, enlazado funcionalmente a

(ii) una primera secuencia de transcripción (ADN STOP) para evitar la transcripción de una segunda secuencia de transcripción, y

(iii) una segunda secuencia de transcripción que codifica un marcador de superficie,

en el que la primera secuencia de transcripción (ADN STOP) evita la transcripción de la segunda secuencia, y también es extraíble condicionalmente de forma que la segunda secuencia de transcripción se puede transcribir para producir una célula transgénica que expresa el marcador de superficie transgénico condicional, y en el que el marcador de superficie torna la célula clasificable a través de la detección del marcador de superficie transgénico condicional.

La segunda secuencia de transcripción que codifica el marcador de superficie, comprende o contiene

- (a) opcionalmente, una primera secuencia de etiqueta para la unión específicamente a un anticuerpo posicionado en la cara citosólica de la membrana plasmática de una célula, o
- (b) un dominio de asociación de transmembrana o membrana para posicionar (anclar) el marcador de superficie en la membrana celular, de forma que el marcador de superficie se puede detectar desde el lado extracelular; y
- (c) una segunda secuencia de etiqueta para hacer que la célula sea separable, especialmente mediante la unión específica en el lado extracelular de una célula a un anticuerpo.

La primera secuencia de etiqueta o el dominio de asociación de transmembrana o membrana puede, en una forma de realización, por lo menos parcialmente solaparse con la segunda secuencia de etiqueta.

En una forma de realización de la invención, este constructo es un vector epigenético. En una forma de realización alternativa, el constructo es un vector que se integra en el interior del genoma de una célula (constructo recombinante). En consecuencia, el marcador de superficie se expresa o bien a partir de un vector epigenético o bien desde el interior del genoma de la célula. Se ha de indicar que un constructo que se ha integrado en el interior del genoma de la célula, en la presente memoria todavía se refiere a un constructo. Un experto en la materia podrá fácilmente distinguir entre un constructo que se ha integrado o no se ha integrado en el genoma.

Para facilitar la introducción de un constructo recombinante según la invención en el interior del genoma de la célula a través de la recombinación homóloga, el constructo recombinante también comprende una parte de la primera secuencia localizada arriba en el gen y una segunda secuencia genética localizada abajo en el gen. La primera parte de secuencia y la segunda parte de secuencia son homólogas a las partes de secuencias correspondientes de la secuencia genómica en el locus marcado para la integración. Los detalles de los requisitos para estas secuencias son conocidos por los expertos en la materia.

La invención también se refiere a la utilización *ex vivo* de un constructo (recombinante) como el descrito anteriormente en la presente memoria para generar un célula que contiene un gen que codifica para un marcador de superficie transgénico condicional que es detectable en la superficie de la célula.

Resulta ventajoso que se pueda utilizar un sistema transgénico de indicación como el descrito en la presente memoria en combinación con diferentes células existentes, líneas celulares u organismos transgénicos que expresan una recombinasa para clasificar muchos tipos de células diferentes.

El problema subyacente también se resuelve mediante un procedimiento para generar una célula tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, que comprende la introducción en una célula de un constructo (recombinante) tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En este procedimiento, es preferible expresar una recombinasa en la célula de una forma constitutiva o inducible. Esta expresión de la recombinasa se puede conseguir transfiriendo un gen de una recombinasa constitutiva o inducible en la célula, por ejemplo, utilizando transfección, transducción viral, lipofección, electroporación, inyección o sus combinaciones. En el caso de que esté presente un organismo que contiene un constructo recombinante tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria en su genoma que no expresa una recombinasa para escindir la primera secuencia de transcripción que bloquea la transcripción del marcador de superficie, es posible cruzar el organismo con un organismo que presente una recombinasa constitutiva, inducible y/o específica del tipo de célula y seleccionar una célula hija que presente tanto el transgén como la recombinasa para permitir que tenga lugar la recombinación.

Se pueden utilizar las recombinasas ampliamente caracterizadas que ya existen y los organismos transgénicos que expresan una recombinasa para clasificar magnéticamente las células, las líneas celulares o los organismos transgénicos que están definidos por el promotor que dirige la expresión de la recombinasa y/o que se define por las propiedades espacio-temporales (Sauer et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 85:5166-5170), tal como resultará evidente a partir de la descripción a continuación.

La posibilidad de utilizar ratones transgénicos bien caracterizados que expresan una recombinasa junto a un ratón que presenta células de la presente invención proporciona la generación conveniente de ratones transgénicos que presentan ambos transgenes, principalmente cruzando los ratones unos con otros.

El gen de la recombinasa se puede introducir en el sistema indicador para el episodio de recombinación mediante diferentes procedimientos, que incluyen pero no limitan, la transfección, la electroporación, la inyección, o el cruce de células, líneas celulares u organismos transgénicos con una segunda entidad biológica o un organismo que exprese una recombinasa constitutiva o inducible en por lo menos algunas células.

Alternativamente a la expresión de la recombinasa, se puede introducir una proteína recombinasa en la célula, por ejemplo, a través de la transfección, la electroporación, la transferencia que utiliza material de empaquetamiento

como las micelas, la inyección, o sus combinaciones. Alternativamente, se puede utilizar una versión permeable de una proteína de tipo recombinasa etiquetada con un dominio de transducción de proteína, por ejemplo, la secuencia TAT (Nolden et al. (2006) Nat. Methods 3:461-467).

5 El problema subyacente se resuelve además mediante un procedimiento para generar un organismo transgénico. Este procedimiento comprende la introducción de un constructo, en especial un constructo recombinante tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria en una célula, por ejemplo, inyectándolo, preferentemente en el núcleo o utilizando la transfección etc., y propagando la célula bajo unas condiciones que permitan el desarrollo de un organismo.

10 En una forma de realización de este procedimiento, es posible, por ejemplo, generar células transgénicas en un ratón mediante recombinación heteróloga u homóloga del constructo en las células (marcaje del gen) madres embrionarias (ES). En este caso, la célula es una célula madre embrionaria que se coloca en un blastocito que se implanta en una madre de alquiler.

15 En otra forma de realización de este procedimiento, es posible, por ejemplo, generar células transgénicas en un ratón mediante una inyección pronuclear introduciendo el constructo recombinante en el pronúcleo de un ovocito que se implanta en una madre de alquiler.

20 En otra forma más de realización de este procedimiento, es posible, por ejemplo, generar células transgénicas en un ratón mediante transferencia del núcleo celular somático con una inyección en el pronúcleo (clonación). En este caso, la introducción del constructo recombinante del procedimiento comprende además las etapas de extracción del núcleo de la célula que contiene el constructo (recombinante), la extracción del núcleo de un ovocito, y la inserción del núcleo de la célula que contiene el constructo recombinante en el ovocito que se implanta en una madre de alquiler. Después, la célula se propaga en unas condiciones que permiten el desarrollo de un organismo. Este organismo es preferentemente un mamífero, especialmente un roedor, como un ratón o una rata.

30 El problema subyacente también se resuelve mediante un procedimiento para separar la célula de una población de células, en el que la célula que se debe separar es una célula como la que se ha descrito anteriormente en la presente memoria (que contiene un gen que codifica para un marcador de superficie transgénico condicional adecuado para clasificar células que es detectable en la superficie de la célula), y en el que el gen que codifica para el marcador de superficie transgénico condicional no está contenido en otras células de la población. Por consiguiente, las otras células no son capaces de expresar un marcador de superficie idéntico.

35 El procedimiento se basa en el descubrimiento de que las células que se caracterizan por la expresión específica de un marcador intracelular o por parámetros espacio-temporales se pueden clasificar mediante una clasificación magnética de células si se obtiene una célula transgénica, una línea celular o un organismo transgénico en el que se utiliza un promotor inducible y/o el promotor de un marcador intracelular para guiar la expresión de un marcador de superficie extracelular o indicador. La presente invención, por consiguiente, permite la separación de células mediante la clasificación de células, en particular mediante la clasificación magnética de células la cual no era posible mediante estos procedimientos precedentes, debido a la falta de un marcador de superficie que es esencial para el procedimiento de clasificación.

45 Este procedimiento comprende las etapas de expresión del marcador de superficie transgénico condicional de tal forma que deviene detectable en la superficie de la célula que se debe separar, pero no en otras células de la población, mediante la extracción de la primera secuencia de transcripción si está presente, y de separación de la célula de la población mediante mecanismos del marcador de superficie transgénico condicional.

50 Preferentemente, la separación se realiza añadiendo un anticuerpo a la población de células que se une específicamente a un epítipo extracelular del marcador de superficie transgénico condicional. Es ventajoso que el anticuerpo se etiquete con un agente detectable adecuado para la clasificación de células (separación de células), como un colorante fluorescente o un agente sensible magnéticamente.

55 Es preferible que el anticuerpo esté acoplado a un agente sensible magnéticamente, con la cual el anticuerpo se puede utilizar para separarlo de la unión celular bajo condiciones suficientes para unir específicamente los anticuerpos del epítipo (antígeno).

60 En una forma de realización preferida, el procedimiento comprende además las etapas siguientes: inmovilización de la célula que expresa el marcador de superficie transgénico condicional que está específicamente unido al anticuerpo marcado con un agente sensible magnéticamente en una matriz ferromagnética a través de un campo magnético; lavado de la matriz para extraer las células no unidas; y extracción del campo magnético para eluir la célula de la matriz. De esta forma, se proporciona una muestra celular enriquecida o que consiste en células transgénicas.

65 La elución de la matriz ferromagnética se puede realizar utilizando flujo de gravedad, centrifugación, filtración por vacío o mediante presión positiva, por ejemplo, utilizando un émbolo.

El término "clasificación magnética de células" se utiliza en la presente memoria para referirse a los procedimientos para la separación de células (clasificación de células) que incluyen de manera no limitativa la separación magnética utilizando anticuerpos unidos a partículas magnéticas coloidales, cromatografía por afinidad y agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o utilizado conjuntamente con una técnica de separación dependiente del anticuerpo conocida en la técnica.

Además, las entidades biológicas se pueden separar mediante "cribado" con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, a una placa. También se puede utilizar la clasificación de células activadas fluorescentemente (FACS) y puede presentar los grados variables de los canales de color, canales de detección de dispersión de ángulo bajo y luz obtusa, y canales de impedancia. Se pueden utilizar las técnicas de separación dependientes del ligando conocidas en la técnica junto con las técnicas de separación tanto positiva como negativa para basarse en las propiedades físicas de las células, líneas celulares u organismos transgénicos más que en la afinidad del anticuerpo, incluyen de manera no limitativa la elutriación y la centrifugación por gradiente de densidad.

Los procedimientos para la separación de células se pueden adquirir comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen, Stem Cell Technologies, en Cellpro, Seattle o Advanced Magnetics, Boston. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales autólogos se pueden unir directamente a partículas de poliestireno magnéticas como Dynal M 450 o partículas magnéticas similares y utilizarlas, por ejemplo, para la separación celular. Alternativamente, los anticuerpos se pueden biotinilar o conjugar con digoxigenina y utilizarse junto con columnas de afinidad recubiertas con avidina o anti-digoxigenina. Sin embargo, en una forma de realización preferida, los anticuerpos monoclonales se utilizan junto con micropartículas superparamagnéticas coloidales que presentan un recubrimiento orgánico, por ejemplo, polisacáridos (Miltényi et al. (1990) Cytometry 11:231-238). Se pueden utilizar estas partículas que presentan un tamaño de 10 a 200 nm, preferentemente entre 40 y 100 nm, y se pueden tanto conjugar directamente para anticuerpos autólogos como utilizarse en combinación con una antiinmunoglobulina, avidina o microesferas específicas para antihapteno. Las partículas superparamagnéticas recubiertas de polisacáridos se pueden conseguir comercialmente de Miltenyi Biotec GmbH, Germany.

Como resultado, el procedimiento proporciona un marcador de superficie extracelular que indica la expresión de un marcador interno y/o una propiedad espacio-temporal y permite la clasificación directa o indirecta de células que incluyen pero no se limitan a, la clasificación magnética, la clasificación por flujo y/o el inmunocribado.

En otras formas de realización de la invención, las células, líneas celulares o los organismos transgénicos que no se han podido clasificar magnéticamente hasta ese momento debido a su falta de marcadores extracelulares o indicadores son clasificables mediante los procedimientos de la presente invención que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes subtipos celulares: astrocitos (en general y dependientes del tiempo) (promotor GFAP), neuronas diferenciadas de forma general (promotor sinapsina), ganglio de la raíz dorsal (promotor sinapsina), dopaminérgico, gabaérgico, serotoninérgico, catecolaminérgico, parvalbúmina, o neuronas positivas a calretinina, células madre hepáticas (GFAP), hepatocitos, células de Kupfer, queratinocitos (K14), células de los islotes pancreáticos (insulina), adipocitos, cardiomiocitos, tratamiento específico (fármacos) o células patológicas como las células reactivas (astrocitos, células madre hepáticas, et.), células metabolizantes (actividad enzimática), célula específica de una región que utilizan un promotor inducible por la luz y/o estados celulares dependientes del tiempo que utilizan, por ejemplo, un promotor inducible por doxiciclina.

Las características de la invención que se han dado a conocer en la descripción anterior, las reivindicaciones y las figuras pueden ser significativas individualmente así como en conjunto para la puesta en práctica de la invención en sus varias formas de realización.

La invención descrita en la presente memoria no hace referencia a un procedimiento para la clonación de seres humanos, a procedimientos para la modificación de la identidad genética de la línea germinal de seres humanos, a usos de embriones humanos con fines industriales o comerciales o a procedimientos para la modificación de la identidad genética de animales que son propensos a causar sufrimiento sin ningún beneficio médico sustancial para el hombre o para los animales, y también para animales que resulten de estos procedimientos.

Descripción de la figuras

En las figuras adjuntas, que se proporcionan para ilustrar la invención:

Figura 1: muestra la estrategia de clonación para el constructo diana, el constructo diana, el locus genómico modificado así como el locus genómico modificado después de la escisión mediada por la recombinasa del casete de STOP.

Figura 2: muestra el análisis citométrico de flujo de la expresión de LNGFR en iSE-LNGFR-EGFP-ES antes de una primera etapa de enriquecimiento (A), después de una primera etapa (B) y una segunda etapa de enriquecimiento (C) utilizando MACSelect K^k MicroBeads (Miltenyi). Las células se tiñeron con CD271 (LNGFR)-FITC. Entre el primer y el segundo enriquecimiento con MACS, las células se cultivaron durante siete días.

Figura 3: muestra la expresión del H-2Kk en células ES de tipo salvaje que se utilizaron para generar el iSE-H2Kk-ES. A, control de isótopo, tinción con mlgG2a-PEB; B, tinción con anti-H-2Kk-PE (Miltenyi).

Figura 4: muestra un análisis de citometría de flujo representativo de iSE-H2Kk-ES, cultivado en condiciones estándares de cultivo de células ES. Un 18,9% de las células expresó el transgén H2Kk en este experimento (teñidas con anti-H-2Kk-PE) (B), mientras que no se detectaron células positivas en la tinción con el isotipo de control (A).

Figura 5: muestra células H2Kk⁻ iSE-H2Kk-ES y células H2k⁺ iSE-H2Kk-ES después de dividir ambas subpoblaciones utilizando MACS y volver a sembrarlas durante dos días.

Figura 6: muestra un análisis por citometría de flujo representativo de células ES de tipo salvaje después de 4 días de diferenciación *in vitro* tal como se ha descrito en los ejemplos. No se detectaron células positivas en la células WT (B) y en la tinción respectiva con el isotipo control de células WT (A).

Figura 7: muestra un análisis por citometría de flujo representativo de células iSE-H2Kk-Es después de 4 días de diferenciación *in vitro* tal como se ha descrito en los ejemplos. Un 39,5% de las células expresó el transgén H2Kk en este experimento (D), mientras que no se detectaron células positivas en la tinción con el isotipo control (C), respectivamente.

Figura 8: muestra el análisis por citometría de flujo que compara la expresión del transgén H2Kk en la población de leucocitos en cuatro líneas de ratones diferentes, de tipo salvaje, iSE-STOP-H2Kk-M1, iSE-mK14-H2Kk-M1 e iSE-fK14-H2Kk-M1. EL panel inferior muestra el isotipo control con tinción de anticuerpo mlgG2a-FITC. La población de leucocitos se caracterizó con mayor detalle mediante la tinción de anticuerpo CD45-APC en el panel superior.

Figura 9: muestra los resultados por citometría de flujo, en los que se determinó el porcentaje de células H2Kk positivo en la piel de ratones iSE-mK14-H2Kk-M1 e iSE-STOP-H₂K^K.

Secuencias

SEC ID N° 1: CD133

SEC ID N° 2: bucle 1 de CD133

SEC ID N° 3: bucle 2 de CD133

SEC ID N° 4 – 8 : TAG2

SEC ID N° 4: NEGVYSDQ (SEC ID N° 4)

SEC ID N° 5: DQNSQDEE

SEC ID N° 6: SDDDEDQE

SEC ID N° 7: DEYDHYVD

SEC ID N° 8: DFKDEDFKD

SEC ID N° 9: secuencia de reconocimiento de la proteasa (PRS) de la proteinasa N1a del virus del grabado del tabaco. E-X-X-Y-X-Q-S/G

Ejemplos

Clonación de los vectores que tienen como diana ROSA26

Para permitir la expresión de un marcador de superficie sobre la escisión mediada por Cre de un casete de STOP, se debía colocar un transgén adecuado bajo el control de un promotor fuerte y expresado de forma ubicua. Se probaron diferentes combinaciones de promotor/indicador midiendo sus respectivos niveles de expresión en líneas celulares transfectadas. Se eligieron diferentes genes como epítopos de superficie por comparación con las microesferas unidas a anticuerpos que ya están disponibles: prominina humana, CD4 humana, y LNGFR humano truncado (CD271, p70). El promotor GAGG (potenciador de ie del citomegalovirus, Promotor de la β-actina de pollo, Intrón de β-globina de conejo y aceptador del corte) combinado con el epítipo ΔhLNGFR o H2Kk obtuvo un mejor resultado en células transfectadas 1881 así como en neuronas primarias y por consiguiente se eligió para los constructos utilizados como diana.

Para conseguir una expresión definida e inducible del indicador, se utilizó un enfoque de silenciamiento del gen. El locus del Gt (ROSA)26Sor (también conocido como ROSA26) ya se había utilizado satisfactoriamente para la expresión de genes indicadores sobre la extracción mediada por cre de los casetes de STOP (Zambrowicz et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:3789-94; Mao et al. (1999) Proc Natl Acd Sci.USA 96:5037-42). Para el enfoque de silenciamiento se construyeron varios vectores diana, iSE-TV (vector diana del epítipo de superficie inducible), que contenían diferentes epítopos de superficie inducibles: iSE-LNGFR-TV; iSE-LNGFR-EGFP-TV; iSE-H2Kk-TV: iSE-H2Kk-EGFP-TV. Todos los vectores diana contenían un gen TK-NEO (para la selección positiva) y un elemento de STOP flanqueado por los sitios lox-P y unos brazos homólogos para hacer diana en el locus de ROSA26, un

promotor CAGG secuencia anterior al primer sitio lox-P, las regiones de codificación del/los respectivos indicadores secuencia posterior al segundo sitio lox-P y el gen DTA secuencia posterior al brazo homólogo (para la selección negativa) (Figura 1). En caso de que se incluyera un elemento mejorado de una proteína verde fluorescente (EGFP), se colocaría detrás de un lado de entrada de un ribosoma interno (IRES) que dirija la expresión de la EGFP.

Se utilizó como vector de inicio el vector básico STOP-ROSA-TV, que contiene el Elemento-Stop flanqueado por los sitios lox-P y los brazos homólogos para hacer diana en el locus de ROSA26 (Kuhn et al. (1995) Science 269: 1427-9). Para integrar el promotor CAGG secuencia anterior al primer sitio lox-P, se digirió el vector ADN con PacI (NEB). Se extrajeron las bases solapadas utilizando ADN polimerasa T4 (Invitrogen) y se realizó la desfosforilización utilizando fosfatasa alcalina (Roche) para evitar la autoligación. El promotor CAGG se aisló a partir de un vector mediante digestión por restricción con MluI y BglII (ambos NEB) y extracción con gel (NucleoSpin® Extract II Kit, Macherey Nagel) de la banda resultante de 1,7 kB. Después de obtener extremos romos en los sitios de restricción (ADN polimerasa T4, Invitrogen), los fragmentos de ADN se ligaron utilizando Kit Rapid DNA Ligation Kiut (Roche) y se transformaron en *E. coli* DH5α competente (Invitrogen). Se realizó el control de calidad del vector resultante CAGG-ROSA-TV mediante análisis de restricción y por secuenciación. Las regiones codificantes de LNGFR y H2KK truncados se amplificaron mediante PCR de pMACS KK y pMACS LNGFR (ambos de Miltenyi Biotec), digeridas con Ascl y XmaI y purificadas mediante extracción con gel. Para mantener un elemento IRES-EGFP de secuencia posterior a las regiones codificantes de LNGFR o H-2KK, se utilizaron cebadores alternativos y los fragmentos de PCR sólo se digirieron utilizando Ascl. Después de la desfosforilización del vector CAGG-ROSA-TV digerido, se ligó con fragmentos de ADN de LNGFR o de H-2KK. Después de la transformación en *E. coli* DH5α competente y del control de calidad, se aisló un plásmido de ADN a gran escala utilizando NucleoBond® Xtra EF Maxi Kit (Macherey Nagel). Antes de la electroporación, los vectores diana se linealizaron utilizando AsiSI (NEB).

Preparación de un constructo apuntando a un gen para la electroporación de células ES

Los iSE-TV se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción, se extrajo mediante fenol/cloroformo, se precipitaron, y se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS). La concentración se determinó mediante medición de la DO. La digestión completa y la integridad de los constructos que tiene como diana un gen linealizado se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Electroporación

Para la electroporación, se descongelaron células madre embrionarias (ES) de ratón y se expandieron durante por lo menos un pase. Las células ES se cultivaron en un medio que contenía 90% de GMEM (Invitrogen), 5% de FCS (Biowest), 5% de NCS (Harlan Sera-Lab), 1 mmol/l de piruvato sódico (Invitrogen), 1x NEA (Invitrogen), 0,5 x pen/strep (Invitrogen) y 1000 U/ml de LIF (ESGRO) en placas recubiertas de gelatina (0,1% G-2500, Sigma) sin nutrientes a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Las celdas se pasan utilizando tripsina/EDTA al 0,05% (Invitrogen). Se mezclaron 1x10⁷ células ES con 30 µg de iSE-TV linealizado y después de 10 minutos de incubación en hielo se transfirieron a la cubeta de electroporación para la electroporación (BioRad Gene Pulser II, 200 V, 500 µF). Después de la corriente, las células ES se incubaron una vez más en hielo durante 10 minutos y después se transfirieron a un medio de células ES, se colocaron en cuatro placas de cultivo tisular de 9 cm con gelatina y se alimentaron diariamente.

Selección y cribado de las células ES

Dos días después de la electroporación, se comenzó la separación mediante la adición de 200 µg/ml de G418 al medio de cultivo. Después de 8-10 días de separación, cuando todas las colonias en una placa de control habían muerto y habían aparecido de forma clara colonias de células ES, las colonias se aislaron, se tripsinizaron, y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con gelatina. Se separaron los pocillos subconfluentes en una placa de cultivo tisular maestra de 96 pocillos con gelatina para congelarse y dos réplicas de placas de cultivo tisular de 96 pocillos con gelatina para el aislamiento del ADN. Las células ES se lisaron, se precipitó el ADN genómico, y se resuspendieron en 50 µl de H₂O en las placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Para el cribado, se utilizó 1 µl de ADN genómico en una reacción de PCR jerarquizada. Se confirmaron las colonias de PCR positivas mediante hibridación con Southern Blot de 3 µg de un ADN genómico adecuadamente linealizado con una sonda (neo) interna.

En el caso del iSE-LNGFR-TV, se escogieron 192 clones de 2 electroporaciones y se cribaron 128 clones mediante PCR dando como resultado 12 clones positivos (iSE-STOP-LNGFR-ES) que se volvieron a cribar adicionalmente de forma positiva para la integración homóloga y de forma negativa para las integraciones heterólogas mediante Southern Blot.

Para el iSE-LNGFR-EGFP-TV, se escogieron 192 clones de células ES y se cribaron 112 dando como resultado 12 clones positivos (iSE-LNGFR-EGFP-ES). Para el iSE-H2Kk-TV, se escogieron 480 clones y se cribaron 480 dando como resultado 7 clones positivos (iSE-H2Kk-ES).

Prueba de funcionalidad *in vitro* de las células iSE-ES

Para comprobar si las células iSE-ES eran funcionales o no, el iSE-STOP-LNGFR-EGFP-ES así como el iSE-STOP-H2Kk-ES se electroporaron con vectores diferentes que codifican para el gen Cre. Las células iSE-ES electroporadas con Cre se sometieron a un análisis FACS antes y después del enriquecimiento con MACS utilizando las microesferas respectivas recubiertas con anticuerpos. Por ejemplo, en el caso de iSE-LNGFR-EGFP-ES se mostró que, después de la transfección con un vector que expresa Cre, un 0,2% de las células ES eran positivas para LNGFR (Figura 2A). Después de una primera ronda de MACS, el porcentaje de LNGFR que expresan clones podía aumentarse a 79% (Figura 2B). Después de 7 días de cultivo y de una segunda ronda de separación de MACS, el porcentaje de LNGFR que expresaban clones fue de 97% (Figura 2C). Este ejemplo muestra que el constructo insertado es funcional en relación a la recombinación de cre y la expresión en la superficie y que los clones que expresan LNGFR se pueden enriquecer mediante MACS. Por consiguiente, las células iSE-STOP-LNGFR-EGFP-ES se pueden utilizar, por ejemplo, como una línea de indicador que permite monitorizar la expresión transitoria de una recombinasa Cre y para clasificar células fr que han sufrido un proceso de recombinación.

En un segundo ejemplo, las células iSE-H2Kk-ES se generaron mediante una escisión mediada por recombinación de cre de la secuencia STOP tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Se sabe por la bibliografía existente que la expresión de MHCI de las células madre embrionarias pluripotentes es más bien baja. Por consiguiente, también era de esperar no encontrar ninguna expresión de un dímero de H2Kk o sólo una expresión de un dímero de H2Kk ya que depende de la expresión de la microglobulina beta-2 endógena. Después, los clones de recombinación de Cre se subclonaron y se cribaron para la expresión de H2Kk. Un clon de iSE-H2Kk-ES que mostraba la expresión de H2Kk se expandió más y se analizó. Mientras que las células ES de tipo salvaje no mostraron ninguna expresión de H2Kk (Figura 3), entre un 10% y un 20% de las células iSE-H2Kk-ES transgénicas fueron positivas para H2Kk (Figura 4). Esto demuestra una vez más la funcionalidad de la silenciamiento del gen de H2Kk y la posibilidad de clasificar las células utilizando el marcador de superficie transgénico recombinado.

Las células ES portadoras de LNGFR atenuado o del marcador de superficie H2Kk así como del marcador de superficie recombinado no mostraron ninguna diferencia con las células ES de tipo salvaje (por ejemplo, en relación a la tasa de duplicación, morfología o comportamiento en la diferenciación espontánea o inducida).

Análisis de la expresión de H2Kk en células iSE-H2Kk-ES

Para analizar más exhaustivamente la diferencia entre las células H2Kk⁺ y H2Kk⁻ iSE-H2Kk-ES, ambas subpoblaciones se dividieron mediante clasificación magnética de células utilizando microesferas de H2Kk (Miltenyi) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células iSE-H2Kk-ES enriquecidas positivamente con H2Kk⁺ se situó dentro de un intervalo del 90% y la recuperación en el 50% mientras que la pureza de las células H2Kk⁻ iSE-H2Kk-ES seleccionadas negativamente se situó de nuevo dentro de un intervalo del 90% y la recuperación en el 60%. Ambas fracciones, las células iSE-H2Kk-ES enriquecidas positivamente con H2Kk⁺ así como las que se pasaron que contenían las células H2Kk⁻ iSE-H2Kk-ES se volvieron a sembrar. Posteriormente, se monitorizó la expresión de H2Kk y se inspeccionó visualmente y por análisis citométrico su apariencia morfológica durante un periodo de 7 días (2 pases). Después de 2 días, las células H2Kk⁻ iSE-H2Kk-ES mostraron una morfología parecida a la de una etapa no diferenciada mientras que las células H2Kk⁺ iSE-H2Kk-ES presentaban una granulación más elevada (también observada en el SSC del análisis por citometría de flujo) y menos colonias uniformes lo que indica una diferenciación parcialmente espontánea (Figura 5). Este ejemplo sugiere una correlación positiva entre la expresión de H2Kk y la etapa de diferenciación de las células iSE-H2Kk-ES.

Análisis de la expresión de H2Kk en células iSE-H2Kk-ES diferenciando células endodérmicas progenitoras

Tal como se ha indicado anteriormente, las células madre embrionarias no diferenciadas muestran poca expresión de MHCI y, por consiguiente, sólo la expresión del dímero del marcador transgénico H2Kk mientras que, por ejemplo, un segundo marcador transgénico LNGFR se expresa en todas las células ES no diferenciadas. Para evaluar la dependencia de la expresión de H2Kk en relación al estado de diferenciación de las células iSE-H2Kk-ES, se realizaron experimentos de diferenciación *in vitro* bajo unas condiciones que promovieran la diferenciación a células endodérmicas progenitoras definitivas tal como se ha descrito en otros documentos (Gouons-Evans et al. 2006). Brevemente, las colonias celulares de células iSE-H2Kk-ES y de células ES de tipo salvaje (control) se tripsinizaron y se sembraron a 20.000 ó 50.000 células/ml en un medio de diferenciación sin suero (SFM) en placas Petri de pureza bacteriana para permitir la formación del cuerpo embrionario (EB). Al segundo día de la diferenciación, se recogieron los EB mediante sedimentación, se separaron con Tripsina/EDTA al 0,05% (Invitrogen) y se volvieron a agregar en un nuevo SFM que contenía 5 µg/ml de Activin A (R&D Systems) en el doble del volumen utilizado inicialmente el día 0. El día 4 de diferenciación, se recogieron los EB mediante sedimentación, se separaron con Tripsina/EDTA al 0,05% (Invitrogen), se lavaron en DPBS (Invitrogen), y después de una centrifugación se incubaron en un reactivo de bloqueo FCR de ratón (Miltenyi Biotec) y PEB (PBS, EDTA 2 mmol/l, BSA 0,05%) según las instrucciones del fabricante. Se determinaron los títulos de anticuerpos de H2Kk-PE (Miltenyi Biotec) mediante titulación y las muestras de control se marcaron utilizando la misma concentración de un anticuerpo de control marcado PE del mismo isotipo (isotipo control de ratón IgG2a, Miltenyi Biotec). Se realizaron mediciones por citometría de flujo con un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson). Las células muertas

se excluyeron del análisis utilizando una tinción positiva de yoduro de propidio y según las propiedades de dispersión. Después de 4 días de diferenciación *in vitro*, la proporción de células que expresaban el H2Kk había aumentado sustancialmente entre 40% y 60% (Figura 6 y Figura 7). Estos resultados implican que las células diferenciadas presentan una capacidad mejor para expresar el transgén H2Kk que las células ES cuando se cultivan en unas condiciones estándares.

Microinyección de blastocito y generación de epítomos de superficie inducibles en líneas de ratón (iSE-MI)

Para la generación de ratones quiméricos de color, se descongelaron clones de células ES sometidos a prueba positivamente, se expandieron y después se recogieron mediante un medio de inyección de blastocito con tampón Hepes. Se obtuvieron los blastocitos de 3,5 días de edad a partir de ratones superovulados de la cepa C57Bl/6 mediante la irrigación del útero aislado con medio M2. Se inyectaron una media de 12 células ES en cada blastocito en el medio M2. Para la incubación (temperatura 37°C, 5% CO₂, humedad saturada), los embriones se transfirieron a un medio M16. Después de la recuperación mediante inyección, los blastocitos supervivientes y reconstituidos plenamente se transfirieron a un medio M2 en el útero de madres de alquiler pseudoembarazadas de la cepa de ratón CD1.

Las crías de las hembras receptoras crecieron y los machos quiméricos de color se cruzaron con hembras C57Bl/6 para determinar la transmisión de la línea germinal de las células ES. Las crías marrones se genotiparon como las células ES mediante análisis de PCR y Southern Blot. Los ratones heterocigotos se volvieron a cruzar con las C57Bl/6 de partida para el mantenimiento de la línea, o se entrecruzaron unos con otros para generar ratones homocigóticos, o se cruzaron con ratones que expresaban Cre para el análisis de los episodios de recombinación y clasificación de algunos tipos de células.

Los blastocitos se inyectaron con las diferentes células iSE - ES. Por ejemplo, dos clones independientes de células ES H2Kk se inyectaron en 246 blastocitos dando como resultado 107 crías incluyendo 33 ratones quiméricos. Se obtuvieron tres de líneas germinales quiméricas (iSE-STOP-H2Kk-Mi) portadoras del transgén y fueron viables. Estos ratones se cruzaron con ratones de tipo salvaje y también se entrecruzaron para obtener las líneas heterocigóticas y homocigóticas de ratón respectivamente.

Mantenimiento de los ratones

Los ratones de Miltenyi Biotec GmbH se alojan en una instalación con barrera SPF (libre de patógenos, según las recomendaciones de FELASA) con un ciclo de 12 horas de luz en jaulas con un filtro superior que se cambia una vez por semana.

Generación y análisis de iSE-mK14-H2Kk-ML y iSE-fK14-H2Kk-Mi

Los ratones iSE-H2Kk se cruzaron con ratones machos y hembras K14-Cre (Pasparakis et al. (2002) Nature 417: 861). Los ratones hembra K14-Cre (fK14) portaban la proteína Cre en sus ovocitos y de esta forma permiten una recombinación del ADN derivado del esperma después de la fusión del núcleo (Hafner et al. (2004) Genesis 38: 176). Por consiguiente, todas las células de los ratones resultantes portan el transgén recombinado. Las crías dieron positivo en las pruebas de escisión en base a la recombinación de la secuencia STOP por PCR a nivel genómico (iSE-mK14-H2Kk-MI). Los ratones con resultado positivos se volvieron a cruzar con ratones wt y las crías se analizaron en busca de la expresión de H2Kk mediante RT-PCR, Western Blot y FACS.

El macho K14-Cre (mK14) expresa el gen Cre específicamente sólo en queratinocitos de la epidermis, folículos capilares y el epitelio de la lengua. Las crías se analizaron en busca de una escisión basada en recombinación de la secuencia STOP mediante PCR en el nivel genómico utilizando biopsias de la cola que consiste parcialmente en queratinocitos (iSE-mK14-H2Kk-MI). El tejido del hígado se utilizó como control y no mostró ningún proceso de recombinación. Las iSE-fK14-H2Kk-MI con resultado positivo se volvieron a analizar en busca de la expresión tisular específica de H2Kk mediante RT-PCR, Western Blot y FACS. Por ejemplo, se ensayaron el tipo salvaje, iSE-STOP-H2Kk-MI, iSE-mK14-H2Kk-MI e iSE-fK14 - H2Kk-MI para la expresión del H2Kk en la sangre. Por consiguiente, los ratones se anestesiaron con ketamina HCl/ Xilacina (0,08 mg/0,012 mg por g de peso corporal, Sigma #K113) y se sacrificaron mediante aspiración sanguínea cardíaca. La coagulación sanguínea se evitó mediante la adición de 14 µl de EDTA (0,5 mol/l, Sigma #E6755) por 1 ml de sangre. Los glóbulos rojos se eliminaron mediante incubación de 1 volumen de sangre con 9 volúmenes de tampón lisis de glóbulos rojos (155 mmol/l de NH₄Cl, 10 mmol/l de KHCO₃, 10 mmol/l de EDTA, pH 7,4) durante 1-3 minutos a temperatura ambiente hasta que la suspensión lechosa roja/sangre turbia se aclaró. Las células restantes se granularon mediante centrifugación con 200xg durante 5 minutos y se volvieron a suspender en PBS (Invitrogen #14190-169) en el volumen de sangre inicial (Invitrogen #14190-169).

La suspensión de leucocitos primero se incubó en hielo con el agente de reacción FCR de ratón (Miltenyi Biotec #130-092-575) 1:10 durante 10 minutos y después con los anticuerpos H2Kk-FITC conjugados con fluorescencia respectivos de ratón (Miltenyi Biotec #130-085-101), de ratón CD45-APC (Miltenyi Biotec #130-091-811) y de ratón IgG2a-FITC (Miltenyi Biotec #130-091-837) cada uno 1:1 l en un volumen final de 100 µl de PBS durante 15 minutos.

La incubación se detuvo añadiendo 10 volúmenes de PBS y centrifugando con 200xg durante 5 minutos. El granulado celular se volvió a suspender en PBS y se utilizó para el análisis FACS con un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson) en una dilución 1:1000 en relación a la suspensión celular inicial. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante una tinción de yoduro de propidio positiva y según las propiedades de dispersión.

La figura 8 muestra el análisis por citometría de flujo que compara la expresión del transgén H2Kk en la población de leucocitos de cuatro líneas de ratón diferentes. El panel inferior muestra el isotipo control con la tinción del anticuerpo MlgG2a-FITC en el panel inferior. La población de leucocitos se caracterizó además con la tinción del anticuerpo CD45-APC en el panel superior. Los ratones de tipo salvaje (WT) no muestran ninguna expresión de H2Kk en la población de leucocitos mientras que el ratón que expresa ubicuamente H2Kk (iSE-fk14-H2Kk-MI) muestra la expresión de H2Kk en toda la población de leucocitos. Los ratones que expresan H2Kk específica para queratinocitos ((iSE-mk14-H2Kk-MI H2Kk/K14-Cre) y el ratón H2Kk heterocigótico ((iSE-STOP-H2Kk-MI) sin eliminación mediada por Cre en la secuencia de STOP de Westphal no mostró la expresión de H2Kk en la población de leucocitos lo que indica un bloqueo fuerte de la expresión de H2Kk del módulo ROSA26-CAGG-STOP-H2Kk. Este ejemplo prueba la expresión *in vivo* del epítipo de superficie inducible.

Para analizar más exhaustivamente si la expresión transgénica del epítipo H2Kk presenta una influencia en la distribución del tipo de células, se determinó el porcentaje de diferentes células inmunológicas en el bazo de iSE-fk14-H2Kk-MI y ratones de tipo salvaje. Con este propósito, se aisló el tejido, se lavó en HBSS (que contenía 10 mmol/l de HEPES), y se cortó en pequeñas partes utilizando un bisturí. El tejido cortado se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 2 ml de HBSS. Después de añadir collagenasa (collagenasa D: 2 mg/ml (según el protocolo de Miltenyi: "Preparation of single-cell suspensions from mouse liver with Collagenase treatment"), Collagenase II, Worthington: 240 U/ml) y DNasa (350 U/ml), el tubo se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos y se invirtió varias veces durante el tiempo de incubación. El tejido se separó completamente presionándolo contra un colador celular (70 µm) utilizando el émbolo de una jeringa estéril. Los coladores se lavaron dos veces con 4 ml de HBSS y la suspensión celular se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se volvió a suspender en un volumen adecuado de tampón de citometría de flujo. La suspensiones de células separadas se marcaron con un anticuerpo conjugado anti H2Kk-PE (clon: H100-27.R55) y el anticuerpo respectivo se dirigió hacia un marcador celular sanguíneo durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y se analizó mediante citometría de flujo. Los detritos celulares, eritrocitos y las células muertas (identificadas mediante yoduro de propidio) se excluyeron del análisis. Los datos se tomaron en un FACS-Calibur (BD-Bioscience).

Tabla 1: análisis de la expresión de H₂Kk⁺ en diferentes subpoblaciones de bazo de iSE-fk14-H2Kk-MI

Marcador celular sanguíneo	Ratón iSE-fk14- H₂Kk^k: Porcentaje de células doble positivo para H₂Kk^k + marcador celular sanguíneo respectivo	Tipo salvaje: Porcentaje de células doble positivo para H₂Kk^k + marcador celular sanguíneo respectivo	Tipo salvaje: Porcentaje de células positivas para el marcador celular sanguíneo respectivo
CD45 (leucocitos)	58,5	5,8	59,3
CD3ε (linfocitos T)	20,66	0,76	17,2
CD25 (Tregs, linfocitos T y B activados)	1,75	0,07	1,77
CD25+CD4 (linfocitos T reguladores Tregs)	0,7	0,07	0,4
CD11c (células dendríticas)	4,1	0,23	2,93
CD19 (linfocitos B)	33,4	1,65	39,7
CD11b (monocitos/macrófagos)	6,5	0,64	5,8
CD8a (linfocitos T citotóxicos)	11,3	0,2	9
CD49b (células NK)	3,3	0,2	3,2

El análisis reveló que todas las células CD45 positivas expresan el marcador de superficie H2Kk. Además, todas las células de las subpoblaciones de sangre específica, identificadas por un marcador específico, también se detectaron con el anticuerpo anti H2Kk. Como control, se tiñeron las células sanguíneas de un ratón de tipo salvaje y se demostró que los diferentes subconjuntos de glóbulos rojos no se reconocían por parte del anticuerpo anti H2Kk. Sin embargo, el porcentaje de células de tipo salvaje, que mostraban la expresión del marcador de células sanguíneas respectivo, es similar al porcentaje de células transgénicas doble positivas para H2Kk y el marcador de células sanguíneas respectivo (tabla 1). Esto demuestra que la expresión del H2Kk transgénico no es tóxica y no presenta efectos perjudiciales.

Se analizó la viabilidad de la separación magnética de células de las células que expresan el H2Kk transgénico

mediante la separación de queratinocitos con H2Kk positivo de tejido de la piel separado de iSE-mK14-H2Kk-MI. Las biopsias de la piel se obtuvieron de ratones P2-P3. La piel se colocó en una placa de Petri que contenía PBS y se cortó en trozos pequeños. Después, el tejido se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml que contenía DMEM sin FBS, tripsina al 0,25% y DNasa (350 U/ml). Después de la incubación a una temperatura de 37 °C durante 1 hora, la reacción enzimática se detuvo añadiendo una cantidad igual de medio DMEM que contenía 10% de FBS. La suspensión se agitó durante 10 segundos y después se pasó por un filtro de 100 µm. El tejido se troceó presionándolo contra un colador celular utilizando el émbolo de una jeringa estéril.

El filtro se enjuagó fuertemente con DMEM (+ 10% FBS) y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspendió en una cantidad adecuada de tampón de citometría de flujo y se determinó el número de células utilizando una cámara de recuento Neubauer.

Tal como se muestra en la Figura 9A y 9B, el análisis de citometría de flujo del tejido de la piel separado obtenido de ratones iSE-mK14- H₂K^k (9A) y ratones iSE-STOP-H₂K^k (9B) marcados con el anticuerpo anti H₂K^k-PE reveló que el 56% de los ratones iSE-mK14- H₂K^k expresaban H2Kk. Se cree que las células H2Kk positivas son queratinocitos. Después, se separó el tejido de la piel de ratones iSE-K14-H2Kk y se aislaron las células H2Kk positivas marcándolas con microesferas de anti H2Kk y un posterior MACS. Después de la separación, las células se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra las microesferas de H2Kk (anticuerpo anti ratón IgG2a-APC). La figura 9C muestra que las células se separaron a una pureza del 95%.

Listado de secuencias

<110> Miltenyi Biotec GmbH

5 <120> Procedimiento para la separación de células

<130> M60667PCT

<150> EP 07022478.7

10 <151> 2007-11-20

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 865

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Met Ala Leu Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn
 1 5 10 15

Ser Phe Ser Gly Gly Gln Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp
 20 25 30

Asn Tyr Glu Leu Pro Ala Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys
 35 40 45

Ala Gly Pro Ile Gly Ile Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr
 50 55 60

Val Val Gln Pro Arg Asp Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu
 65 70 75 80

Gln Lys Ala Tyr Glu Ser Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val
 85 90 95

Ile Leu Gly Leu Lys Ile Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys
 100 105 110

Cys Val Leu Gly Leu Leu Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr
 115 120 125

Phe Phe Cys Met Cys Arg Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His
 130 135 140

Gln Arg Gln Lys Glu Asn Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Val Ile Cys Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly
 165 170 175

Phe Val Ala Asn His Gln Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys
 180 185 190

Leu Ala Asp Ser Asn Phe Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr
 195 200 205

Pro Glu Gln Ile Lys Tyr Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp
 210 215 220

Lys Ala Phe Thr Asp Leu Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Asp Arg Leu Arg Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile
 245 250 255

Lys Ser Met Ala Thr Ala Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn
 260 265 270

Met Asn Ser Thr Leu Lys Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser
 275 280 285

Ser Ser Leu Thr Ser Val Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp
 290 295 300

Pro Leu Cys Leu Val His Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Gln Leu Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro
 325 330 335

Pro Val Asp Ala Glu Leu Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp
 340 345 350

Leu Asp Gly Leu Val Gln Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro
 355 360 365

Asp Arg Val Gln Arg Gln Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg
370 375 380

Val Leu Asn Ser Ile Gly Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu
385 390 395 400

Pro Ile Gln Asp Ile Leu Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr
405 410 415

Glu Ser Tyr Ile His Arg Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser
420 425 430

Tyr Trp Trp Leu Gly Gly Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile
435 440 445

Val Ile Phe Tyr Tyr Leu Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp
450 455 460

Arg His Ala Thr Pro Thr Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly
465 470 475 480

Val Phe Leu Met Val Gly Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile
485 490 495

Leu Met Ile Ile Val Val Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu
500 505 510

Lys Leu Ile Cys Glu Pro Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu
515 520 525

Asp Thr Pro Tyr Leu Leu Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly
530 535 540

Lys Leu Phe Asn Lys Ser Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr
545 550 555 560

Ser Asp Cys Lys Lys Asn Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln
565 570 575

Asn Ser Phe Asn Ile Ser Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly
580 585 590

Ser	Ile	Ser	Ser	Glu	Leu	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Asn	Leu	Asn	Ile	Phe	595	600	605	
Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Asn	Leu	Gln	Asp	Phe	Ala	Ala	Cys	610	615	620	
Gly	Ile	Asp	Arg	Met	Asn	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Leu	Ala	Gln	Thr	Gly	Lys	625	630	635	640
Ser	Pro	Ala	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Tyr	Asp	Leu	Glu	Ala	645	650	655	
Lys	Ala	Asn	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Arg	Asn	Ser	Leu	Lys	Arg	660	665	670	
Asp	Ala	Gln	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile	His	Gln	Gln	Arg	Val	Leu	Pro	Ile	675	680	685	
Glu	Gln	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	Tyr	Gln	Ser	Val	Lys	Ile	Leu	Gln	Arg	690	695	700	
Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	Val	Thr	Arg	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	705	710	715	720
Asp	Phe	Ala	Gln	Asn	Phe	Ile	Thr	Asn	Asn	Thr	Ser	Ser	Val	Ile	Ile	725	730	735	
Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Tyr	Gly	Arg	Thr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Glu	His	740	745	750	
Tyr	Leu	Gln	Trp	Ile	Glu	Phe	Ser	Ile	Ser	Glu	Lys	Val	Ala	Ser	Cys	755	760	765	
Lys	Pro	Val	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Thr	Ala	Val	Asp	Val	Phe	Leu	Cys	770	775	780	
Ser	Tyr	Ile	Ile	Asp	Pro	Leu	Asn	Leu	Phe	Trp	Phe	Gly	Ile	Gly	Lys	785	790	795	800
Ala	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	805	810	815	

Lys Tyr Tyr Arg Arg Met Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu
820 825 830

Thr Ile Pro Met Lys Asn Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys
835 840 845

Asp His Val Tyr Gly Ile His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln
850 855 860

His
865

<210> 2
<211> 256
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn His Gln Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys Leu Ala Asp
1 5 10 15

Ser Asn Phe Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr Pro Glu Gln
20 25 30

Ile Lys Tyr Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp Lys Ala Phe
35 40 45

Thr Asp Leu Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly Ile Leu Asp
50 55 60

Arg Leu Arg Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile Lys Ser Met
65 70 75 80

Ala Thr Ala Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn Met Asn Ser
85 90 95

Thr Leu Lys Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser Ser Ser Leu
100 105 110

Thr Ser Val Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp Pro Leu Cys
115 120 125

Leu Val His Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg Leu Ser Leu
130 135 140

Ser Gln Leu Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro Pro Val Asp
145 150 155 160

Ala Glu Leu Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly
165 170 175

Leu Val Gln Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro Asp Arg Val
180 185 190

Gln Arg Gln Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Val Leu Asn
195 200 205

Ser Ile Gly Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu Pro Ile Gln
210 215 220

Asp Ile Leu Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr Glu Ser Tyr
225 230 235 240

Ile His Arg Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser Tyr Trp Trp
245 250 255

<210> 3

<211> 289

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu Lys Leu Ile Cys Glu Pro Tyr
1 5 10 15

Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu Asp Thr Pro Tyr Leu Leu Asn
20 25 30

Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly Lys Leu Phe Asn Lys Ser Lys
35 40 45

Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Asn Arg
50 55 60

10

Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln Asn Ser Phe Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80

His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly Ser Ile Ser Ser Glu Leu Glu
85 90 95

Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe Leu Leu Gly Ala Ala Gly Arg
100 105 110

Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys Gly Ile Asp Arg Met Asn Tyr
115 120 125

Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Asn Leu
130 135 140

Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Lys Ala Asn Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg Asp Ala Gln Thr Ile Lys Thr
165 170 175

Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile Glu Gln Ser Leu Ser Thr Leu
180 185 190

Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg Thr Gly Asn Gly Leu Leu Glu
195 200 205

Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu Asp Phe Ala Gln Asn Phe Ile
210 215 220

Thr Asn Asn Thr Ser Ser Val Ile Ile Glu Glu Thr Lys Lys Tyr Gly
225 230 235 240

Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His Tyr Leu Gln Trp Ile Glu Phe
245 250 255

Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys Lys Pro Val Ala Thr Ala Leu
260 265 270

Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu
275 280 285

Asn

5 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> TAG2, sin homología con ninguna secuencia de mamífero existente

<400> 4

Asn	Glu	Gly	Val	Tyr	Ser	Asp	Gln
1					5		

5 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> TAG2, sin homología con ninguna secuencia de mamífero existente
 <400> 5

Asp	Gln	Asn	Ser	Gln	Asp	Glu	Glu
1				5			

15 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> TAG2, sin homología con ninguna secuencia de mamífero existente

25 <400> 6

Ser	Asp	Asp	Glu	Asp	Gln	Glu	Gln
1				5			

<210> 7
 30 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> TAG2, sin homología con ninguna secuencia de mamífero existente
 <400> 7

Asp	Glu	Tyr	Asp	His	Tyr	Val	Asp
1				5			

40 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> TAG2, sin homología con ninguna secuencia de mamífero existente
 <400> 8

50 **Asp Phe Lys Asp Glu Asp Phe Lys Asp**
1 5

<210> 9
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de reconocimiento de proteasa
 60 <220>

<221> Misc_característica
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser un aminoácido natural

5 <220>
 <221> Misc_característica
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser puede ser alternativamente Gly

15 <400> 9

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Célula que contiene un gen que no está presente en esta forma en un tipo salvaje de la célula, y que codifica un marcador de superficie extracelular transgénico condicional que es detectable sobre la superficie de la célula,

en la que el gen que codifica un marcador de superficie transgénico condicional comprende:

(i) un promotor para dirigir la transcripción de una primera secuencia de transcripción, enlazado funcionalmente a

(ii) una primera secuencia de transcripción para evitar la transcripción de una segunda secuencia de transcripción, y

(iii) una segunda secuencia de transcripción que codifica el marcador de superficie, que comprende

(a) un dominio de asociación de membrana o transmembrana para anclar el marcador de superficie en la membrana celular, y

(b) una segunda secuencia de etiqueta para tornar una célula clasificable,

de manera que la primera secuencia de transcripción es extraíble condicionalmente de forma que la segunda secuencia de transcripción puede ser transcrita, y

de manera que el marcador de superficie torna la célula clasificable a través de la detección del marcador de superficie transgénico condicional sobre la superficie de la célula.

2. Célula según la reivindicación 1, en la que el marcador de superficie se expresa ectópicamente o es una forma modificada de una proteína que se expresa endógenamente, no cumpliendo la forma modificada la misma función que la proteína que se expresa endógenamente;

en la que la primera secuencia de transcripción se puede escindir mediante una reacción no enzimática o mediante una reacción enzimática;

en la que la primera secuencia de transcripción está flanqueada sobre cada lado por un sitio de reconocimiento de recombinasa para la extracción condicional de la primera secuencia de transcripción del gen;

en la que la primera secuencia de transcripción es extraíble condicionalmente por una recombinasa, en particular por una recombinasa CRE o una recombinasa FLP; y/o

en la que la segunda secuencia de transcripción es un gen de entre el grupo que consiste en LNGFR, CD4, H2Kk, CD133, CD271, CD4, H2Kk, CD2, CD14, CD90 o CD45 en una forma sin modificar o modificada.

3. Célula según la reivindicación 1 ó 2, en la que el promotor es un promotor de un gen de entre el grupo que contiene: actina, CAGGS, hCMV, PGK, FABP, Lck, CamKII, CD19, queratina, albúmina, aP2, insulina, MCK, MyHC, WAP, Col2A, Mx, tet, Trex y ROSA26.

4. Constructo para la generación de una célula transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con un gen que codifica un marcador de superficie transgénico extracelular condicional que comprende

(i) un promotor para dirigir la transcripción de una primera secuencia de transcripción, enlazado funcionalmente a

(ii) una primera secuencia de transcripción para evitar la transcripción de una segunda secuencia de transcripción, y

(iii) una segunda secuencia de transcripción que codifica un marcador de superficie extracelular, que comprende

(a) un dominio de asociación de membrana o transmembrana para anclar el marcador de superficie extracelular en la membrana celular, y

(b) una segunda secuencia de etiqueta para tornar una célula clasificable,

de manera que la primera secuencia de transcripción es extraíble condicionalmente de forma que la segunda secuencia de transcripción puede ser transcrita, y

de manera que el marcador de superficie extracelular torna la célula clasificable a través de la detección

del marcador de superficie transgénico condicional sobre la superficie de la célula.

5. Constructo según la reivindicación 4, que comprende además una primera parte de secuencia aguas arriba del gen y una segunda secuencia génica aguas abajo del gen para la recombinación homóloga con una secuencia genómica, siendo opcionalmente, la primera parte de secuencia y la segunda parte de secuencia homólogas a las partes de secuencia correspondientes de la secuencia genómica.
6. Utilización *ex vivo* de un constructo según la reivindicación 4 ó 5, para la generación de una célula clasificable que contiene un gen que codifica un marcador de superficie extracelular transgénico condicional que es detectable sobre la superficie de la célula.
7. Procedimiento *ex vivo* para generar una célula clasificable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la introducción de un constructo según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 en una célula.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende además la expresión de una recombinasa de manera constitutiva o inducible.
9. Procedimiento para la generación de un organismo transgénico no humano que comprende las etapas siguientes
 - introducir un constructo según las reivindicaciones 4 o 5 en una célula no humana, y
 - propagar la célula bajo unas condiciones que permitan el desarrollo de un organismo.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la célula es una célula madre embrionaria no humana o una célula madre embrionaria como una célula adulta no humana reprogramada que se dispone en un blastocito no humano que se implanta en una madre de alquiler no humana.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el constructo se introduce en el pronúcleo de un ovocito no humano que se implanta en una madre de alquiler no humana.
12. Procedimiento para la separación de una célula de una población de células, siendo la célula que se debe separar una célula según las reivindicaciones 1 a 3, y en el que el gen que codifica el marcador de superficie extracelular transgénico condicional no está contenido en otras células de la población, que comprende las etapas siguientes
 - expresar el marcador de superficie extracelular transgénico condicional para tornar la célula clasificable a través de la detección del marcador de superficie extracelular transgénico condicional, y
 - separar la célula de la población mediante el marcador de superficie extracelular transgénico condicional expresado.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la separación se realiza añadiendo un anticuerpo a la población de células que se une específicamente al marcador de superficie extracelular transgénico condicional, en el que el anticuerpo se marca opcionalmente con un agente detectable, tal como un colorante fluorescente o un agente sensible magnéticamente.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el agente detectable es un agente sensible magnéticamente.
15. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende además las etapas siguientes
 - inmovilizar la célula unida específicamente al anticuerpo etiquetado con un agente sensible magnéticamente en una matriz ferromagnética a través de un campo magnético,
 - lavar la matriz para extraer las células no unidas, y
 - extraer el campo magnético para eluir la célula de la matriz.

FIGURA 1

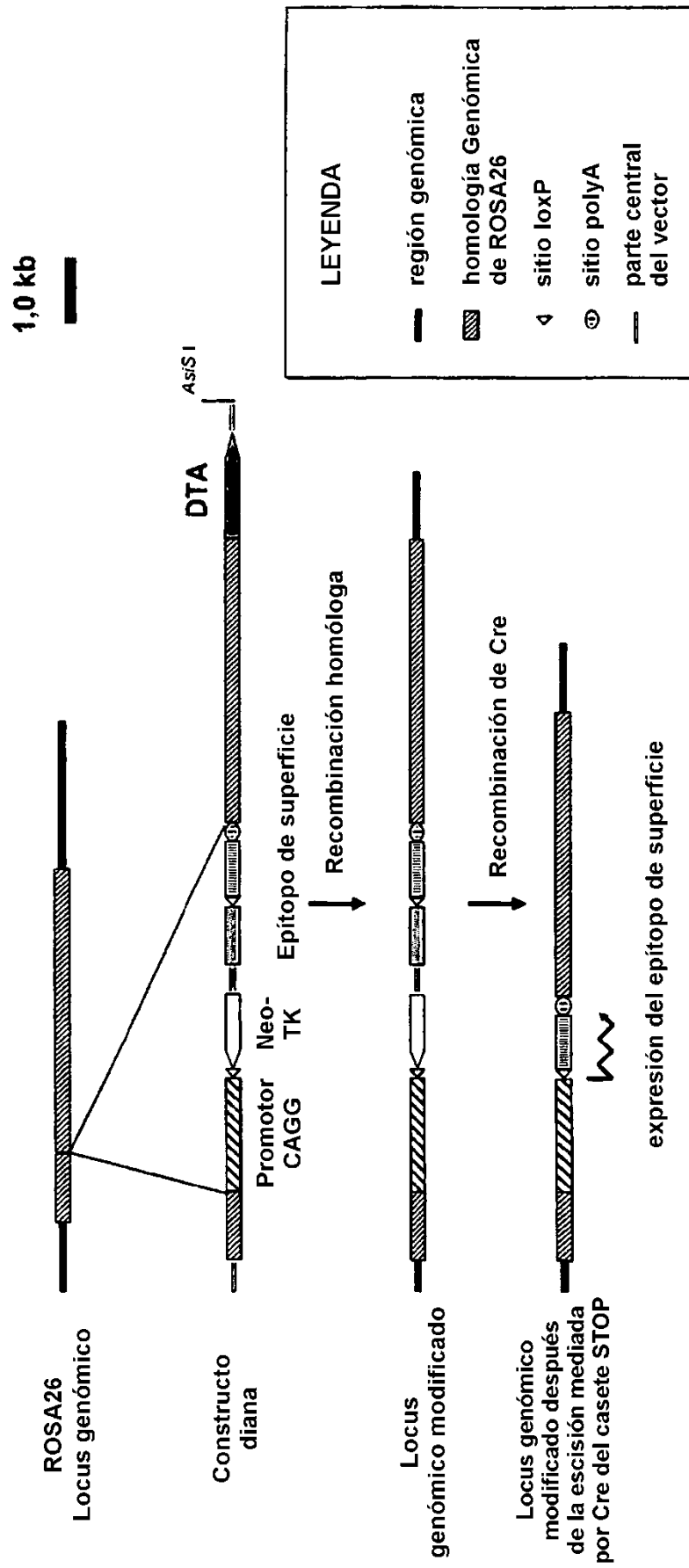


FIGURA 2

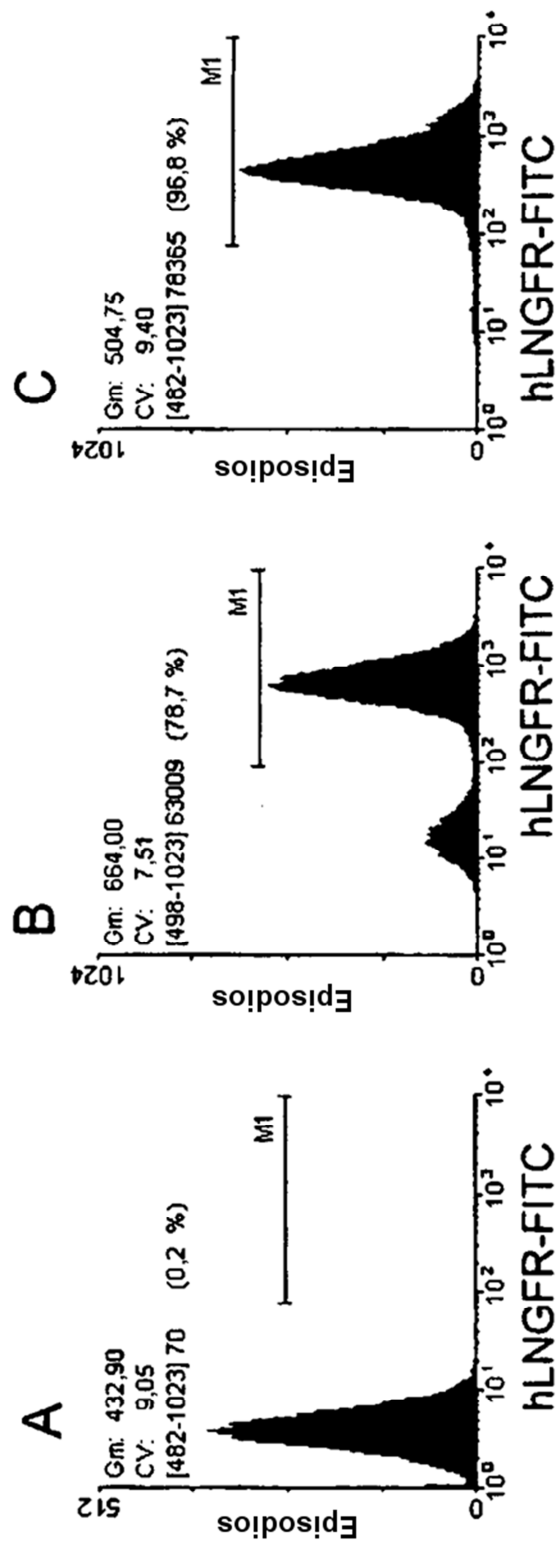


FIGURA 3

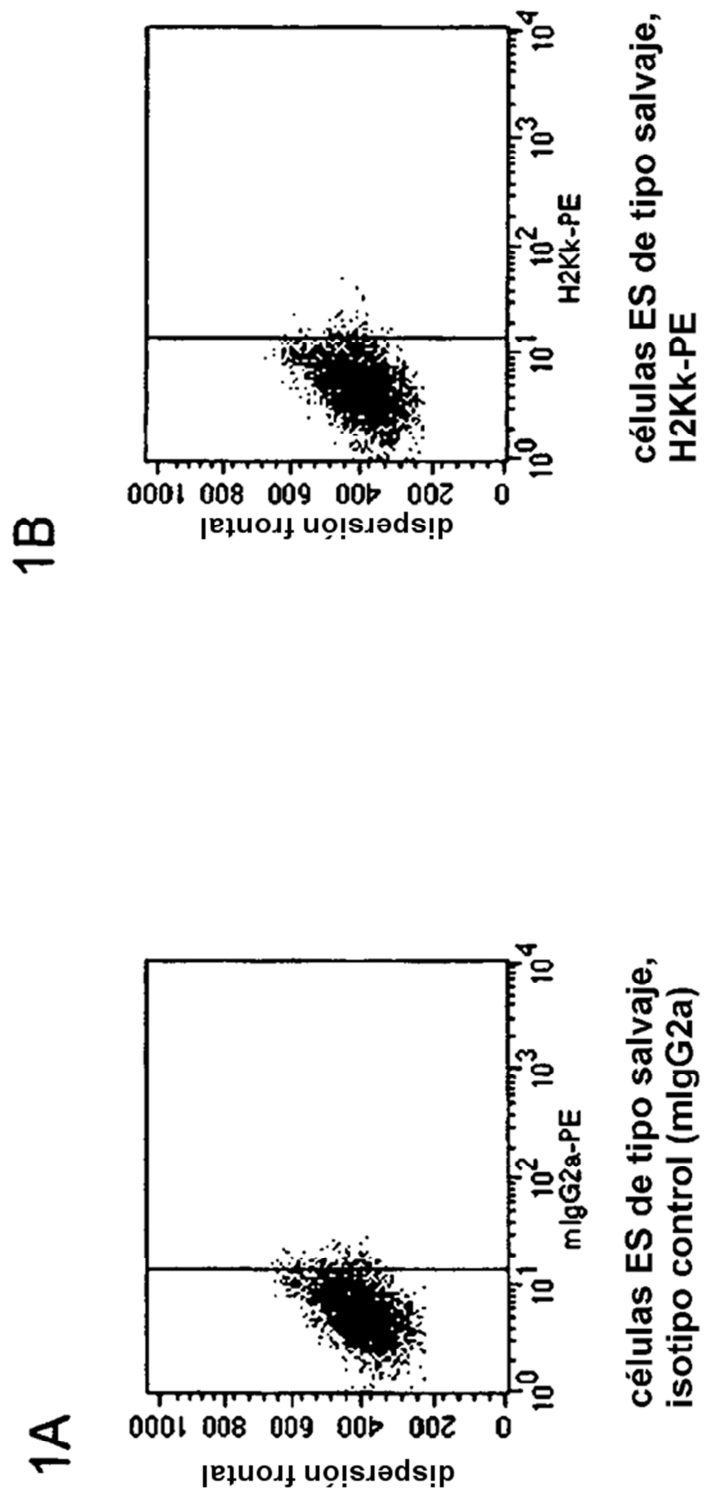


FIGURA 4

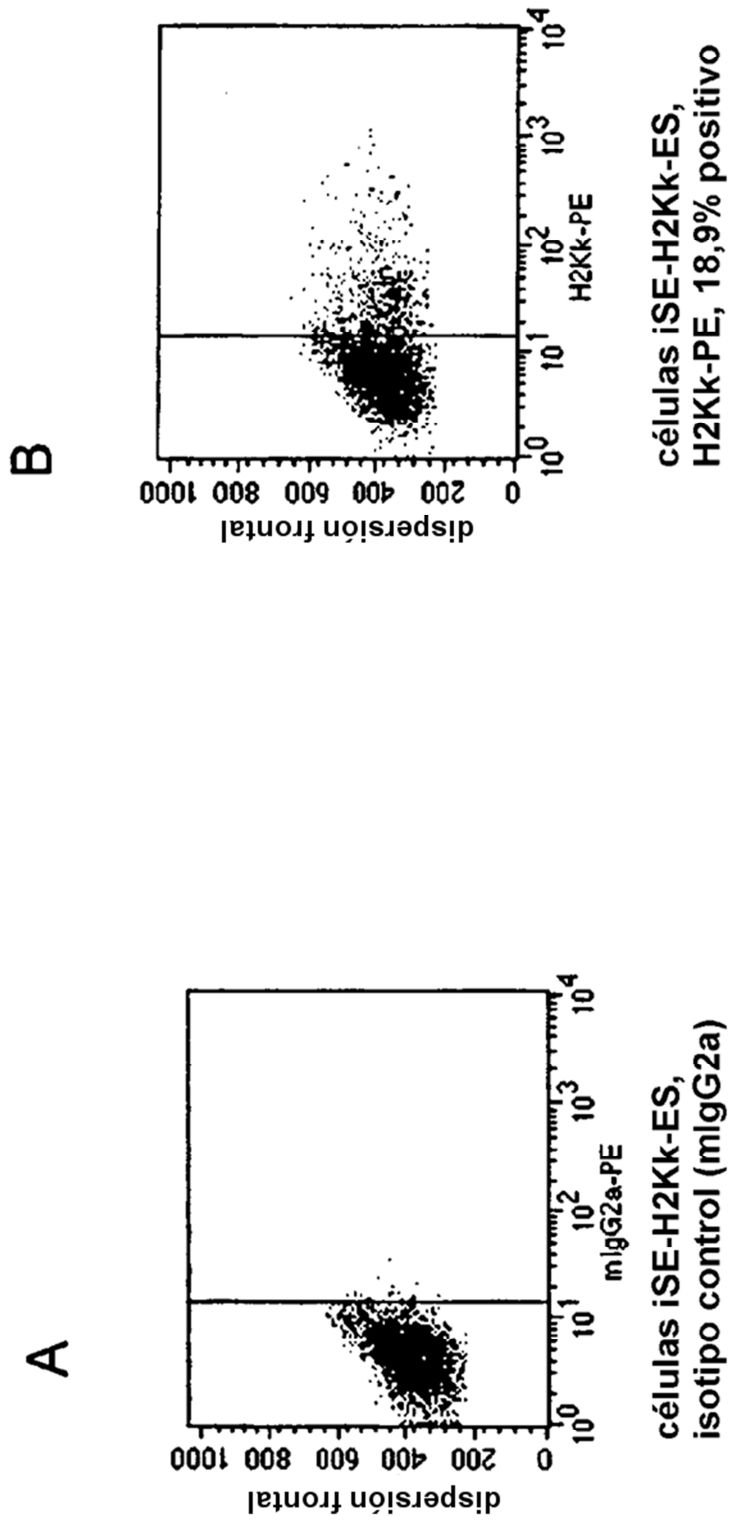
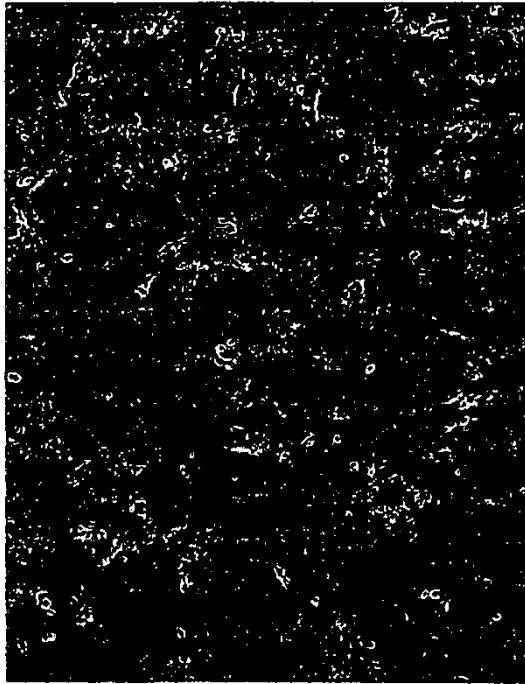
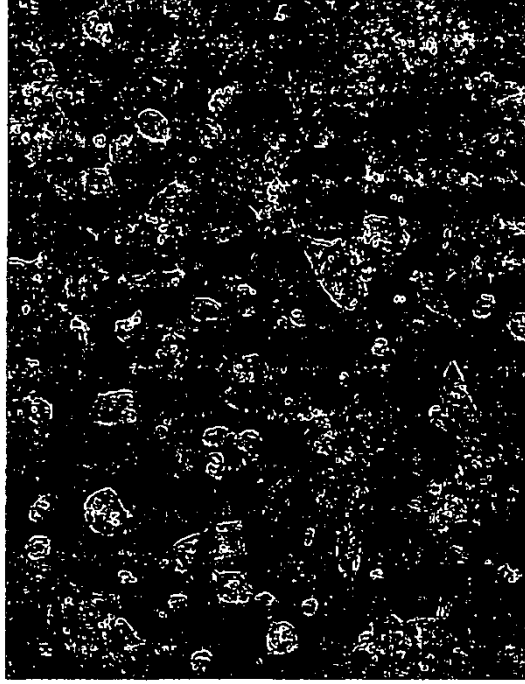


FIGURA 5



**Células H2Kk+ iSE-H2Kk-ES,
2 días después de MACS**



**Células H2Kk- iSE-H2Kk-ES,
2 días después de MACS**

FIGURA 6

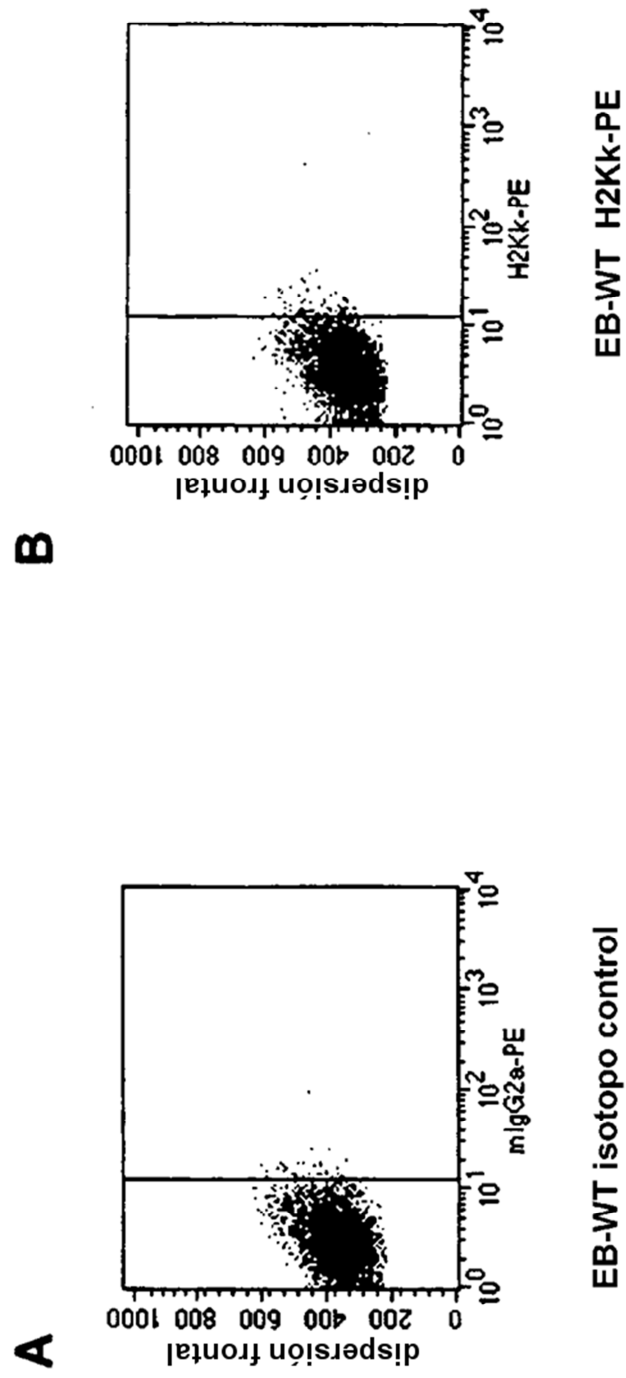
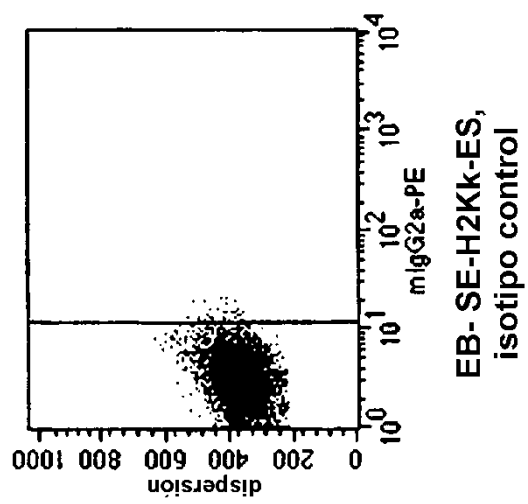
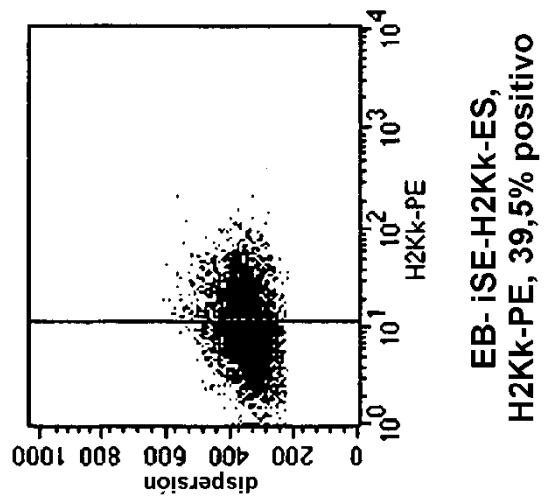


FIGURA 7

A



B



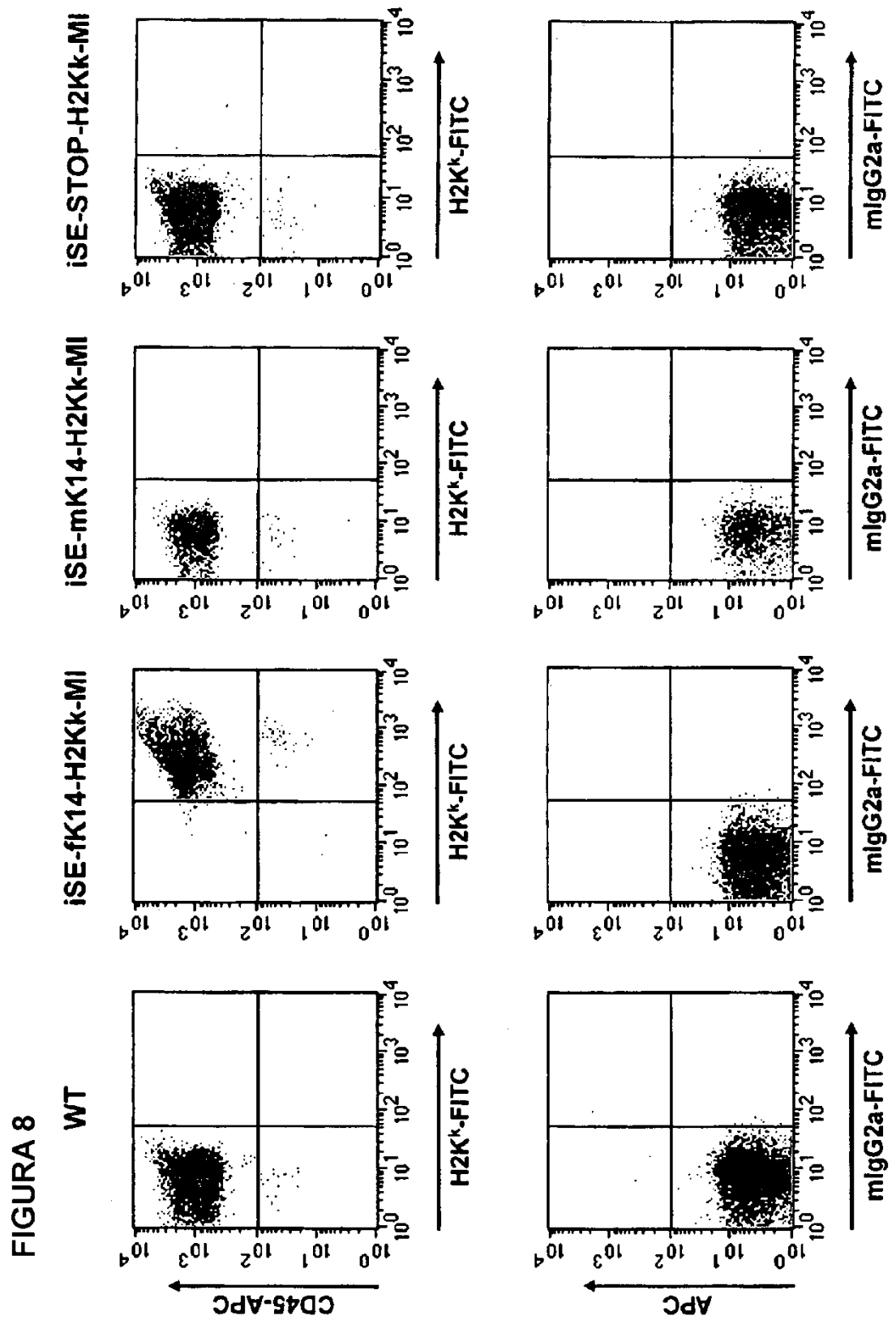


FIGURA 9

