



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 156 460**

⑫ Número de solicitud: **009401470**

⑬ Int. Cl.⁷: **C12N 15/12, C12N 15/62**

C12N 15/85, C12N 15/867

C12N 5/10, A01K 67/027

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **07.07.1994**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2001**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.06.2001**

⑱ Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA
DE BARCELONA**
08193 Bellaterra, Barcelona, ES

⑲ Inventor/es: **Bosch Tubert, Fátima y
Valera Abril, Alfons**

⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉑ Título: **Animal transgénico no humano que sobreexpresa el gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa para su utilización en el estudio de la diabetes mellitus y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la enfermedad.**

㉒ Resumen:

Animal transgénico no humano que sobreexpresa el gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa para su utilización en el estudio de la diabetes mellitus y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la enfermedad.

Se refiere a un minigen que utiliza una parte del gen y del cDNA (ADN complementario) de la PEPCK (P-enolpiruvato carboxiquinasa) o gen de la PEPCK modificado por una etiqueta dirigidos por un promotor o fusión de promotores.

También se refiere a un vector de expresión que permite expresar PEPCK en cualquier tipo celular y a un animal transgénico no humano que expresa un minigen de la PEPCK para su utilización en el estudio de la diabetes mellitus y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la enfermedad.

También se refiere a un cromosoma de los animales transgénicos no humanos citados que contiene el gen quimérico citado y a un minigen o gen modificado de la PEPCK para la utilización en estudios sobre las causas fisiopatológicas de la diabetes mellitus.

Finalmente se refiere a un tipo celular originado a partir de animales transgénicos no humanos y a un tipo celular que expresa el minigen o gen modificado de la PEPCK según cualquiera de los vectores citados.

Facilita el estudio de la diabetes mellitus.

ES 2 156 460 A1

DESCRIPCION

Animal transgénico no humano que sobreexpresa el gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa para su utilización en el estudio de la diabetes mellitus y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la enfermedad.

La presente invención se refiere en primer lugar a un minigen obtenido tras substitución de parte de los intrones y exones del gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) por el fragmento correspondiente de su propio cDNA, a fin de poder diferenciarlo del gen endógeno de la PEPCK. También hace referencia al gen completo de la PEPCK al que se ha unido una etiqueta, entendiéndose por este término un fragmento de DNA exógeno que permite diferenciarlo del gen endógeno de la PEPCK, en un análisis por Southern blot del DNA aislado de un animal transgénico no humano o células en cultivo.

Más concretamente se refiere al diseño de un animal transgénico no humano que sobreexpresa un minigen o un gen modificado de la PEPCK dirigido por fragmentos de su propio promotor, que permitan la expresión del minigen o gen modificado principalmente en hígado o en hígado y tejido adiposo de los animales. El gen de la PEPCK codifica por un enzima clave en el control de la vía gluconeogénica principalmente en hígado, riñón, tejido adiposo, yeyuno, etc. También está involucrado en el control de la vía glicerogénica en tejido adiposo. La sobreexpresión de la PEPCK en animales transgénicos no humanos causa hiperglucemia, resistencia a insulina y diabetes mellitus.

La invención se refiere también a otros objetos que se describen más adelante.

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) es el desorden metabólico más común. Comprende una gran variedad de síndromes con distintas etiologías que afectan colectivamente del 1 al 6 % de la población mundial (Taylor, R. and Agius, L. (1988) *Biochem. J.* 250, 625-640; McGarry, J. D. (1992) *Science* 258, 766-770). La NIDDM, al menos en estadios iniciales, no presenta una deficiencia de insulina sino una incapacidad de la hormona de actuar eficientemente en tejidos diana como músculo, hígado o tejido adiposo, proceso conocido como resistencia a la insulina (McGarry, J.D. (1992) *Science* 258, 766-770). Todas las formas de diabetes mellitus no dependiente de insulina se caracterizan por la presencia de hiperglucemia y desarrollo de patología microvascular en la retina y en los glomérulos del riñón y de complicaciones neurológicas (Ruderman, N.B., et al. (1992) *FASEB J.* 6, 2905-2914; Williamson, et al. (1993) *Diabetes* 42, 801-813). Como consecuencia de esta patología microvascular, la diabetes mellitus es la principal causa de ceguera en adultos y la responsable de gran número de casos de fallo renal crónico. La diabetes también incrementa el riesgo de desarrollo de aterosclerosis prematura y aumenta la mortalidad por infarto de miocardio, enfermedad cerebrovascular y vascular periférica (Schneider, D.J. (1993) *Diabetes* 42, 1-7). Además, la NIDDM se asocia a menudo con obesidad (DeFronzo, R.A., et al. (1992) *Diabetes Care* 15, 318-368).

A pesar de una gran inversión de recursos, no existe aún una clara comprensión de los mecanismos patogénicos básicos de la diabetes. Avances recientes en este campo han mostrado la gran complejidad del problema. Varios defectos moleculares se han asociado con la resistencia a la insulina: por ejemplo defectos genéticos en el receptor de la insulina (Taylor, S.I., (1992) *Diabetes* 41, 1473-1490; Flier, J.S. (1992) *Diabetes* 41, 1207-1219), mutaciones en el gen de la glucoquinasa (Permutt, M.A., et al. (1992) *Diabetes* 41, 1367-1372; Rnadle, P.J. (1993) *Diabetologia* 36, 269-275) o de la glucógeno sintasa (Groop, L.C., et al. (1993) *N. Engl. J. Med.* 328, 10-14). Sin embargo, estas alteraciones genéticas son responsables únicamente de un pequeño número de casos de NIDDM. Las causas primarias de la mayoría de los casos de esta enfermedad son desconocidas.

El principal factor que contribuye a la hiperglucemia en ayuno en la diabetes mellitus no dependiente de insulina, es la producción excesiva de glucosa por el hígado. Un incremento en la vía gluconeogénica es el responsable de los niveles elevados de glucosa en NIDDM tras el ayuno nocturno, lo cual, a su vez, provoca una demanda de secreción de insulina incrementada y sostenida (DeFronzo, R.A., et al. (1989) *Metab. Clin. Exp.* 38, 387-395; Consoli, A., et al. (1989) *Diabetes* 38, 550-557; Magnuson, I., et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 1323-1327). La forma citosólica de la PEPCK es un enzima regulador de la gluconeogénesis (Exton, J.H. and Park, C.R. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2622-26360. La actividad de la PEPCK está regulada a nivel de la transcripción de su gen. El AMP cíclico y los glucocorticoides incrementan la expresión de la PEPCK en hígado, mientras que la insulina la inhibe (Lamers, W.H., et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5137-5141; Granner, D.K., et al. (1983) *Nature* 305, 549-551; Magnuson, M.A., et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14917-14920). Por tanto, este gen es altamente sensible a las principales hormonas reguladoras de la homeostasia de la glucosa, el glucagón y la insulina.

A fin de determinar el papel de la PEPCK en el incremento de la producción hepática de glucosa y en el desarrollo de resistencia a insulina y NIDDM se ha sobreexpresado en animales transgénicos no humanos un minigen de la PEPCK bajo control de su propio promotor. Estos animales muestran que la sobreexpresión de un único enzima, la PEPCK, provoca hiperglucemia en ayuno, hiperinsulinemia, descenso en el almacenamiento de glucógeno en hígado y test de tolerancia a la glucosa alterado, características presentes en NIDDM en humanos. Estos animales transgénicos no humanos pueden proporcionar información sobre los mecanismos mediante los cuales la hiperglucemia puede llevar a resistencia a insulina y diabetes. Además, este modelo animal puede ser utilizado en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la diabetes.

Descripción de la invención

La invención tiene por objeto un minigen que utiliza el gen de la PEPCK en el que se ha substituido parte de los exones e intrones por el fragmento correspondiente de su propio cDNA (ADN complementario) dirigido por su propio promotor

o fusión de promotores, preferentemente regulables y activados por el proceso diabético.

La P-enolpiruvato carboxiquinasa es un enzima clave en el control de la vía gluconeogénica, y se encuentra principalmente en el hígado, riñón yeyuno y tejido adiposo. La actividad de este enzima se regula a nivel de la expresión de su gen (Hanson, R.W., et al. (1976) *Gluconeogenesis: Its regulation in mammalian species*. John Wiley & Sons, Inc. New York). La expresión del gen de la PEPCK se encuentra finamente regulada por hormonas. En los fragmentos del promotor de la PEPCK utilizados (-450 pb a +73 pb y -2080 pb a +73 pb) se han descrito secuencias que responden a AMPc, a glucocorticoides y a insulina (Wynshaw-Boris, A., et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12161-12169; Wynshaw-Boris, A., et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9714-9720; Short, J.M., et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9721-9726; O'Brien, R.M., et al. (1990) *Science* 249, 533-537). El glucagón actuando vía AMPc, y los glucocorticoides activan la expresión del gen, mientras que la insulina inhibe dicha expresión. En animales diabéticos, la expresión del gen de la PEPCK está incrementada debido al aumento de los niveles plasmáticos de glucagón y al descenso en los niveles de insulina (Tilghman, S.M., et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1304-1308; Hopgood, M.F., et al. (1973) *Biochem. J.* 134, 445-453; Kioussis, D., et al. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4327-4332). Estos fragmentos del promotor de la PEPCK son capaces de dirigir la expresión del gen de la hormona de crecimiento de manera regulada y específica de tejido en animales transgénicos no humanos (McGrane, M.M., et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11443-11451; McGrane, M.M., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 22371-22379; Short, M.K., et al. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1007-1020; Eisenberger, C.L. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1396-1403). Se ha demostrado que el promotor de la PEPCK puede dirigir la expresión del gen quimérico PEPCK/hormona de crecimiento a hígado, riñón, yeyuno y tejido adiposo de animales transgénicos no humanos. Además, y de manera similar al gen endógeno de la PEPCK, los genes quiméricos dirigidos por el promotor de la PEPCK no se empiezan a expresar hasta después del nacimiento (McGrane, M.M., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 22371-22379; Short, M.K., et al. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1007-1020; Eisenberger, C.L. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1396-1403). Así pues, el promotor de la PEPCK puede dirigir la expresión de un minigen PEPCK de manera regulada fisiológicamente a los mismos tejidos en que se expresa el gen endógeno de la PEPCK.

Por tanto, al fusionarse este promotor de la PEPCK a un minigen de la PEPCK, o a un gen modificado de la PEPCK, se sobreproducirá PEPCK en los tejidos donde se expresa su promotor, los cuales son los mismos que los que expresan la PEPCK endógena.

La invención tiene, pues, por objeto la creación de un minigen PEPCK/PEPCK modificada. Este minigen se ha introducido en células de hepatoma en cultivo mediante transfección transitoria, observándose que se producía en estas células un

incremento en los niveles de RNAm específico de la PEPCK.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fusión de promotores o elementos reguladores de genes que permitan incrementar el nivel de expresión en los mismos tejidos u órganos que el gen endógeno de la PEPCK (hígado, riñón, tejido adiposo, intestino, etc.).

Esta invención también tiene por objeto un vector de expresión que permite sobreexpresar PEPCK al introducirse en diferentes tipos celulares, más particularmente, un vector plasmídico pPEPCKminigen. También pueden utilizarse otros vectores de expresión virales (retrovirus, adenovirus, herpes virus, papilomavirus, etc.) o no virales.

La invención tiene por objeto, además, animales transgénicos no humanos que sobreexpresan diferentes minigenes de la PEPCK, así como un tipo celular originado a partir de estos animales transgénicos no humanos.

En el laboratorio se han obtenido ratones transgénicos mediante la técnica de microinyección de DNA (minigenes PEPCK) a óvulos fecundados de ratón antes de la fusión de los dos pronúcleos femenino y masculino.

Otro objeto de la invención es el cromosoma de los animales transgénicos no humanos que contiene el minigen.

Finalmente, la invención tiene por objeto un minigen del tipo descrito anteriormente, para la utilización en el estudio del proceso diabético y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para diabetes mellitus.

Breve descripción de los dibujos

Para mejor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos referidos a ejemplos de realización.

En dichos dibujos, las figuras 1 y 2 representan la construcción de dos minigenes de la PEPCK, a partir del plásmido pB7.0 que contiene el gen de la PEPCK de rata y el plásmido p(-2000)PEPCK, que contiene un fragmento del promotor de la PEPCK de 2000 pb. Estos minigenes de la PEPCK han sido utilizados en la obtención de animales transgénicos no humanos.

Ejemplos de realización

Para la construcción del (-485 pb) minigen PEPCK (Fig. 1) se partió del plásmido pB7.0 (Yoo-Warren, H., et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3656-3660) que contiene el gen de la PEPCK de rata y 485 pb de la zona flanqueante 5'. El fragmento SphI-SphI de dicho gen (del exón 4 al 10) se eliminó y se sustituyó por el fragmento SphI-SphI del cDNA de rata, obtenido tras digestión con SphI del plásmido pPCK10 (Yoo-Warren, H., et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3656-3660). De esta manera se obtenía un minigen que contenía las secuencias codificantes de la PEPCK completas y del que se habían eliminado únicamente parte de los intrones no codificantes. Los intrones 1-3 presentes en el minigen permiten expresar el minigen "in vivo" y estabilizar el RNAm del minigen. Este plásmido se ha denominado p(-485)PEPCKminigen.

Para la construcción del (-2000 pb) minigen PEPCK (Fig. 2) se obtuvo el fragmento XbaI-XbaI de la PEPCK, que contenía las secuen-

cias -2000 a -485 pb, a partir del plásmido (p(-2000)PEPCK) (McGrane, M.M., et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 22371-22379). Este fragmento se introdujo en el lugar XbaI (-485 pb) del minigen de la Fig. 1. De esta manera se obtenía un minigen de la PEPCK dirigido por un fragmento de su propio promotor de 2000 pb. Este plásmido se ha denominado p(-2000)PEPCKminigen.

A continuación se expone brevemente el proceso de obtención de un animal transgénico no humano que expresa el (-485)minigen PEPCK y (-2000)minigen PEPCK.

Una vez verificado que los minigenes eran funcionales mediante transfección de células en cultivo, se procedió a microinyectarlos (fragmentos BamHI-BamHI) a óvulos fecundados de ratón antes de la fusión de los dos pronúcleos femenino y masculino según el método descrito por Wagner, et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5016. Estos embriones eran posteriormente transferidos a una madre receptora. De los animales obtenidos se aisló DNA a partir de un fragmento de cola y a continuación, se analizó la presencia del transgén mediante Southern blot y posterior hibridación con una sonda específica fragmento SphI-SphI del cDNA de la PEPCK. Con los ani-

males transgénicos no humanos se han establecido colonias, en las que se ha analizado la expresión del minigen. Así, los animales transgénicos no humanos obtenidos expresan el transgén en los tejidos donde normalmente se expresa la PEPCK endógena. Este incremento en la expresión del gen de la PEPCK se refleja en un incremento en la producción de glucosa a partir de precursores gluconeogénicos en hepatocitos en cultivo primario de los ratones transgénicos. Estos animales presentan niveles séricos de glucosa en ayunas más elevados que los de ratones control. Esta hiperglucemia viene acompañada de hiperinsulinemia, lo cual indica que los animales transgénicos no humanos han desarrollado resistencia a insulina. Los niveles de glucógeno hepático también están más disminuidos en los ratones transgénicos respecto a los controles, lo cual es característico de resistencia a insulina. Estos animales presentan una curva de tolerancia a la glucosa alterada, dado que tras una inyección intraperitoneal de glucosa se alcanzan niveles séricos del azúcar mucho más elevados que en animales control. Ello indica que estos ratones desarrollan diabetes mellitus no dependiente de insulina.

REIVINDICACIONES

1. Minigen que utiliza una parte del gen y del cDNA (ADN complementario) de la PEPCK (P-enolpiruvato carboxiquinasa) o gen de la PEPCK modificado por una etiqueta dirigidos por un promotor o fusión de promotores.

2. Minigen según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que los promotores son regulables y son activados por el proceso diabético.

3. Minigen según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que se obtiene por la fusión del minigen de la PEPCK al propio promotor de la PEPCK.

4. Procedimiento de fusión de promotores o elementos reguladores de genes que permitan expresar la PEPCK en cualquier tipo celular.

5. Vector de expresión que permite expresar PEPCK en cualquier tipo celular.

6. Vector plasmídico pPEPCKminigen según la reivindicación 5, que permite expresar PEPCK en cualquier tipo celular.

7. Vector retrovítico vPEPCKminigen según

la reivindicación 5, que permite expresar PEPCK en cualquier tipo celular.

8. Animal transgénico no humano que expresa un minigen de la PEPCK según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

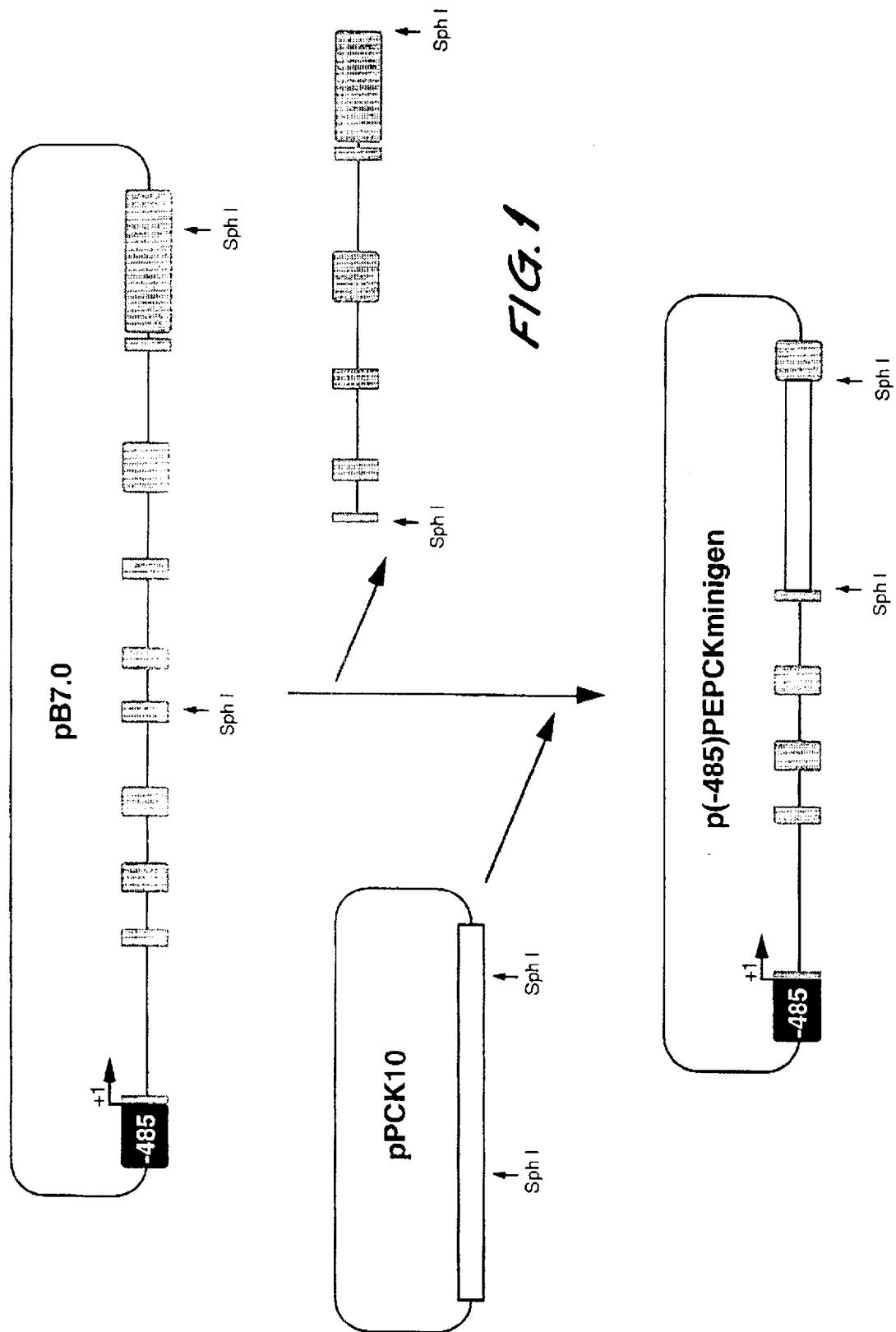
9. Tipo celular originado a partir de los animales transgénicos no humanos de la reivindicación 8.

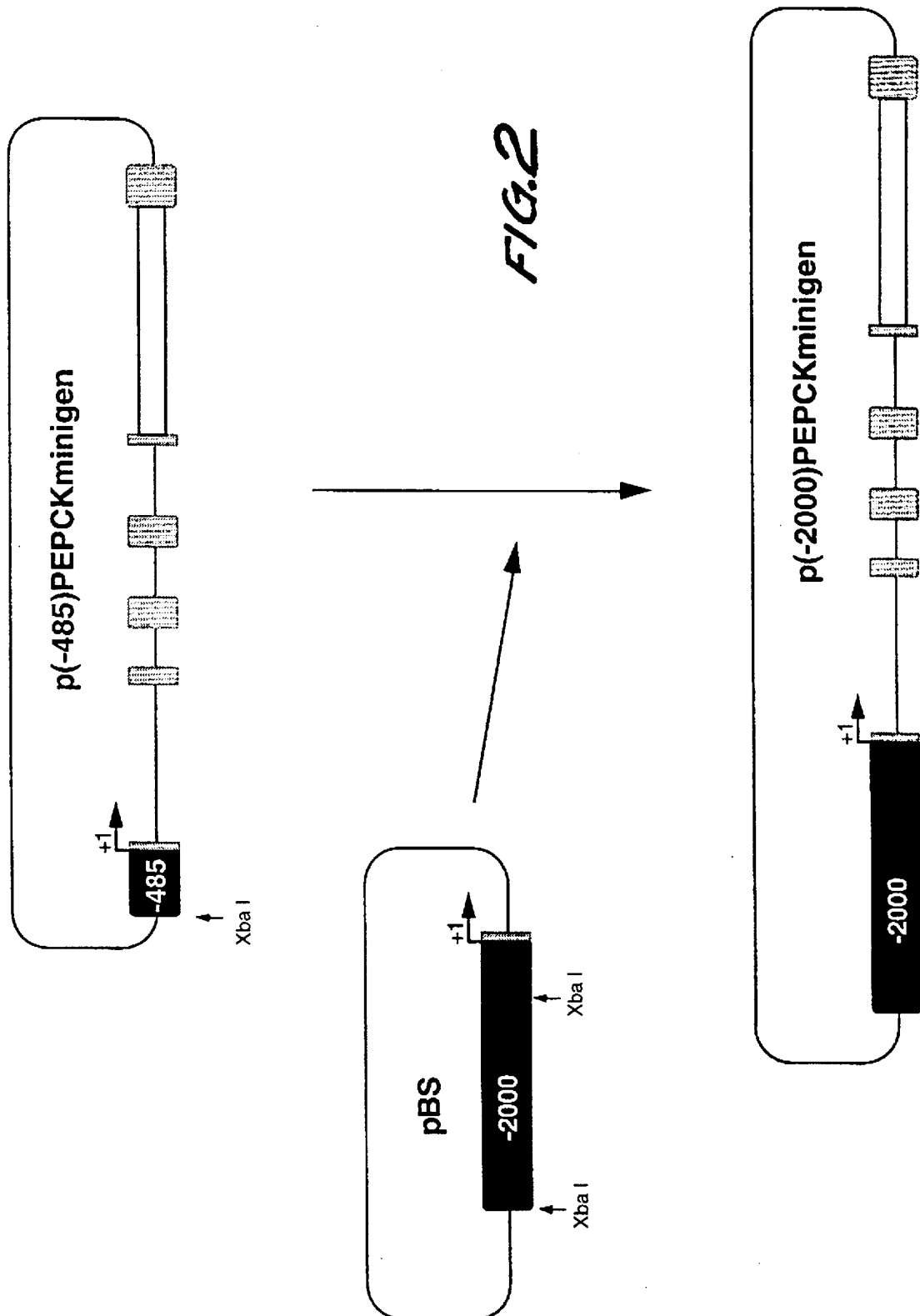
10. Cromosoma de los animales transgénicos no humanos de la reivindicación 8, que contiene el gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11. Minigen o gen modificado de la PEPCK según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en estudios sobre las causas fisiopatológicas de la diabetes mellitus.

12. Animal transgénico no humano según la reivindicación 8 para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para diabetes mellitus.

13. Tipo celular que expresa el minigen o gen modificado de la PEPCK según cualquiera de los vectores de las reivindicaciones 5 a 7.







OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 156 460

⑫ N.º solicitud: 009401470

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.1994

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/12, 15/62, 15/85, 15/867, 5/10, A01K 67/027

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| Y | YOO-WARREN, H. et al., "Isolation and characterization of the gene coding for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the rat". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, Vol. 80, páginas 3656-3660. | 1-7 |
| Y | HATZOGLOU, M. et al., "Hepatic Gene Transfer in Animals Using Retroviruses Containing the Promoter from the Gene for Phosphoenolpyruvate Carboxykinase". J. Biol. Chem., 1990, Vol. 265 (28), páginas 17285-17293. | 1-3,5-7 |
| Y | HATZOGLOU, M. et al., "Hormonal Control of Interacting Promoters Introduced into Cells by Retroviruses". J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266 (13), páginas 8416-8425. | 2-7 |
| A | GURNEY et al., "Metabolic Regulation of Gene Transcription". J. Nutr., 124, 1994, páginas 15335-15395. | 2-13 |
| A | WO 8810304 A (EDISON ANIMAL BIOTECHNOLOGY CENTER) 29.12.1988, página 9, líneas 1-35; página 17, líneas 1-14; página 21, línea 31 - página 22, línea 16. | 2-7 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
07.02.2001

Examinador
A. Collados Martín Posadillo

Página
1/1