(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 190 311**

(21) Número de solicitud: 200002221

(51) Int. Cl.[7]: C12N 15/52
C12N 15/62
C12N 15/79
A61K 48/00
A01K 67/027

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **31.08.2000**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.07.2003**

(71) Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

(72) Inventor/es: **Feliú Albiñana, Juan Emilio; Sánchez Gutiérrez, Julio César; Bosch Tubert, Fátima y Pujol Altarriba, Anna**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

(54) Título: **Gen quimérico para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la intolerancia hereditaria a la fructosa.**

(57) Resumen:
Gen quimérico para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la intolerancia hereditaria a la fructosa.
Comprende un promotor unido al gen o al ADNc de la fructoquinasa. Dicho gen quimérico se inserta en una célula hepática, permitiendo la expresión de fructoquinasa.
También se refiere a un animal transgénico cuyo genoma comprende dicho gen quimérico y desarrollando, dicho animal transgénico, alteraciones asociadas a la intolerancia hereditaria a la fructosa tras la administración de fructosa, sorbitol o sacarosa.

ES 2 190 311 A1

DESCRIPCION

Gen quimérico para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a la intolerancia hereditaria a la fructosa.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar a un gen quimérico que utiliza el gen o ADNc (ADN complementario) de la fructoquinasa (FK, EC 2.7.1.3.) dirigido por un promotor.

La invención se refiere también a un animal transgénico que sobreexpresa dicho gen quimérico y su utilización para el estudio de la intolerancia hereditaria a la fructosa y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a esta enfermedad.

Antecedentes de la invención

La intolerancia hereditaria a la fructosa (IHF) es una enfermedad autosómica recesiva con una frecuencia estimada de 1 en 20.000 nacimientos, provocada por una deficiencia en aldolasa B (fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, EC 4.1.2.13.) en el hígado, riñón e intestino. Este enzima participa en el metabolismo de la fructosa, ya que es capaz de hidrolizar la fructosa 1-fosfato (F-1-P) (formada por acción de la fructoquinasa) en dihidroxiacetona-P y gliceraldehido (Gitzelman, R. et al. (1995) Disorders of Fructose Metabolism. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds., 7th ed. McGraw Hill, New York, 905-934). Los pacientes afectados de IHF sufren dolor abdominal, vómitos e hipoglucemia tras la ingestión de fructosa, sorbitol o sacarosa, siendo más frecuente la aparición de este cuadro clínico al cesar la lactancia materna. Además, la ingesta continuada de fructosa causa una intoxicación crónica que puede llevar al fracaso hepático y a la aparición de cirrosis, a acidosis renal tubular y a retardo del crecimiento (Gitzelman, R. et al. (1995) Disorders of Fructose Metabolism. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds., 7th ed. McGraw Hill, New York, 905-934).

El estudio histopatológico de biopsias hepáticas muestra esteatosis en las células parenquimatosas, cierto grado de necrosis y fibrosis periportal e intralobular, que en etapas más avanzadas de la enfermedad puede dar lugar a cirrosis. Por el contrario, en el riñón los cambios son discretos, incluyendo cierto grado de granulación y vacuolización de las células epiteliales de los túbulos proximales (Black, J.A. & Simpson, K. (1967) Fructose tolerance. *Br. Med J.* 4, 138-141).

El tratamiento de la IHF consiste en la eliminación estricta de la fructosa, sorbitol y sacarosa de la dieta. El diagnóstico temprano de la enfermedad es necesario para su correcto tratamiento. El diagnóstico de confirmación se realiza por ensayo de la actividad aldolasa B en biopsias de hígado o intestino (Gitzelman, R. et al. (1995) Disorders of Fructose Metabolism. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds., 7th ed. McGraw Hill, New York, 905-934). La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos sintéticos apropiados ha facilitado el análisis del defecto molecular subyacente en la IHF. En la población europea más del 90 % de los afectados por IHF presentan la mutación sin sentido A149P en el gen de la aldolasa B, siguiéndoles en frecuencia las mutaciones A174D y N334K (Cox, T.M. (1994) Aldolase B and fructose intolerance. *FASEB J.* 8, 62-71; Ali, M. & Cox, T.M. (1995) Diverse mutations in the aldolase B gene that underlie the prevalence of hereditary fructose intolerance. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1002-1005).

Tras el descubrimiento de la IHF, la toxicidad de la fructosa se pensó que estaba limitada a pacientes con defecto en aldolasa B. Sin embargo, al final de la década de los sesenta se observó que la administración intravenosa de fructosa, incluso a sujetos sanos, provocaba graves alteraciones, entre las que destacaban hipoglucemia, hipofosfatemia, hiperuricemia y acidosis láctica (Perheentupa, J. & Raivio,K. (1967) Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 2, 528-531; Bergstrom, J. et al. (1968) Lactic acid accumulation in connection with fructose infusion. *Acta. Med. Scan.* 184, 359-364). Estudios llevados a cabo en diferentes animales, tras administración de fructosa, demostraron que en los tejidos capaces de metabolizar la fructosa como hígado, corteza renal y células epiteliales del intestino delgado, poseedores de fructoquinasa, aldolasa B y trioquinasa, se producía un marcado incremento de los niveles celulares de F-1-P, metabolito prácticamente indetectable en condiciones normales (Gitzelman, R. et al. (1995) Disorders of Fructose Metabolism. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds., 7th ed. McGraw Hill, New York, 905-934). Así, en el hígado la F-1-P puede alcanzar niveles de hasta 10 mM tras una sobrecarga de fructosa. El acúmulo hepático de F-1-P se produce por el desbalance existente entre la Vmax (unas 10 U/g) de la fructoquinasa, primer enzima de la vía y sin regulación alostérica alguna, y la Vmax de la aldolasa B (unas 2 U/g) segundo enzima de la vía, creándose así una supuesta "trampa" de ATP, lo que provoca la caída de los niveles celulares de ATP y de Pi de hasta el 70 %. Los bajos niveles de ATP, junto con el acúmulo de F-1-P sería la causa de la inhibición de la gluconeogénesis hepática. Del mismo modo parece producirse un bloqueo de la glucogenolisis, supuestamente por inhibición de la glucógeno fosforilasa por la F-1-P y la baja concentración celular de fosfato inorgánico (P_i). Todo lo anterior explicaría el bloqueo de la producción hepática de glucosa con la consiguiente hipoglucemia (Van den Berghe, G. (1975) Biochemical aspects of hereditary fructose intolerance, in hommes. *Normal and Pathological Development of Energy Metabolism.* Van den Berg, C.J. eds, London, Academic, 211-228). Por otro lado, el acúmulo de F-1-P en el hígado parece provocar la activación de la piruvato quinasa-L con un aumento de la formación de lactato, lo que podría dar lugar a acidosis láctica (Woods, H.F. et al. (1970) The cause of hepatic accumulation of fructose 1-P on fructose loading. *Biochem. J.* 119, 501-510). La causa de la hiperuricemia hay que situarla en el aumento del catabolismo de purinas por activación de la AMP deaminasa por caída de la concentración celular de ATP/GTP y Pi, inhibidores fisiológicos de este enzima (Van den Berghe, G. (1978) Me-

tabolic effects of fructose in the liver. *Curr. Top. Cell. Regul.* 13, 97-137).

Hasta el momento, no se han descrito modelos animales de IHF. Sólo se ha descrito un modelo de intolerancia a la fructosa por la expresión de la fructoquinasa en levaduras, las cuales acumulaban fructosa 1-P en presencia de fructosa y enlentecían su crecimiento (Donaldson, A. et al. (1993) Expression of rat liver ketohexokinase in yeast results in fructose intolerance. *Biochem. J.* 291, 179-185). Así pues, los animales transgénicos de la presente invención constituyen un modelo animal adecuado para el estudio de las alteraciones patológicas asociadas a IHF.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una construcción génica que comprende un promotor o fusión de promotores unido/s operativamente al gen o el ADNc de la fructoquinasa caracterizado en que cuando se inserta en una célula hepática permite la expresión de fructoquinasa.

En una realización preferida de la invención, dicho promotor es el promotor de la PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa).

La presente invención también se refiere a un vector de expresión (viral o no viral) que comprende dicha construcción génica. Un ejemplo de vector de expresión según la invención es un vector plasmídico que contiene el gen quimérico PEPCK/FK.

También son objeto de la presente invención células hepáticas que expresan un transgen según la invención. La introducción de dicho transgen en dichas células se realiza mediante un vector de expresión según la invención.

La presente invención hace referencia también a animales transgénicos cuyo genoma contiene un transgen que comprende un promotor o fusión de promotores unido operativamente al gen de la fructoquinasa. En una realización preferida de la invención, el genoma de dichos animales transgénicos contiene un transgen que comprende el promotor de la PEPCK unido operativamente al gen de la fructoquinasa. Dichos animales se caracterizan por el hecho de que desarrollan alteraciones asociadas a la intolerancia hereditaria a la fructosa tras la administración de fructosa, sorbitol o sacarosa.

En una realización preferida de la invención, dicho animal transgénico es un mamífero y en una realización aún más preferida, dicho animal transgénico es un ratón.

Los animales transgénicos según la invención muestran un incremento en los niveles de ARNm de fructoquinasa en hígado respecto a ratones normales. Dicho incremento es más acentuado en condiciones de ayuno que en condiciones de alimentación, ya que es en estas condiciones cuando se expresa principalmente el promotor de la PEPCK. Como consecuencia, los ratones transgénicos según la invención muestran un considerable aumento de la actividad fructoquinasa respecto a ratones normales. Al aumentar la actividad FK se produce un gran aumento en la concentración intracelular de fructosa-1-P, debido a la incapacidad de la aldolasa B de metabolizarla con suficiente velocidad en dihidroxicetona-P y gliceraldehido. Este incremento del desajuste entre las actividades FK y aldolasa B en hígado causa un acúmulo crónico de fructosa-1-P.

De forma ventajosa, la expresión de fructoquinasa por parte del hígado en los animales transgénicos según la invención es compatible con la supervivencia normal del animal, que presenta unos niveles tanto de insulina como de glucosa en suero similares a los de los ratones control.

Los animales transgénicos según la invención presentan intolerancia a la fructosa, de manera que si se les inyecta fructosa por vía intravenosa, se observa un un aumento considerable, de 3 a 5 veces, en los niveles de fructosa-1-fosfato y una disminución de más del 50 % en los niveles hepáticos de ATP en los transgénicos respecto a ratones normales.

Los animales transgénicos según la invención son especialmente útiles para el estudio de la intolerancia hereditaria a la fructosa y en particular para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a dicha enfermedad.

Ejemplos

A continuación se muestran algunos ejemplos a modo ilustrativo no limitativo de la invención.

Ejemplo I

Obtención de un gen quimérico que incluye el ADNc de la fructoquinasa

Para obtener el gen quimérico PEPCK/FK, se fusionó el promotor del gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (fragmento *Xba*I-*Bgl*II de -450 pb a +73 pb) al ADNc del gen de la fructoquinasa (FK) de rata. Para obtener niveles elevados y estables de ARNm *in vivo* a partir de un ADNc, es necesario introducir intrones y exones de otros genes. Para ello, se han utilizado los intrones y exones del gen de la β-globina. El ADNc de la FK se ha introducido en el segundo exón de la β-globina (lugar de clonación *Eco*RI) en el vector PEPCK/β-globina (Valera et al. (1994) Overexpression of mitochondrial 3-hydoxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in transgenic mice causes hepatic hyperketogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 6267-6270). Este vector permite la expresión de genes exógenos en el hígado de animales transgénicos.

Ejemplo II

Ratón transgénico que expresa el ADNc de la fructoquinasa en hígado

II.1. *Generación del ratón transgénico*

El ratón transgénico se obtuvo a partir de la microinyección del gen quimérico PEPCK/FK descrito en el ejemplo anterior.

Los oocitos fertilizados se recogieron mediante el vaciado de los oviductos de las ratonas donantes 12 horas después del apareamiento. A continuación se inyectaron de 2 a 3 pl de una solución de ADN (4 ng/μl) que contenía el gen quimérico, separado del resto del plásmido, fragmento *Not*I-*Xho*I, en el pronúcleo del zigoto. Los zigotos inyectados se implantaron en el oviducto de hembras pseudogestantes, aproximadamente 10 zigotos por lado [Hogan et al. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York].

A las 3 semanas después del nacimiento se analizó la presencia del transgén en la descendencia mediante análisis de transferencia e hibri-

dación Southern (*Southern blot*) de 10 μg de ADN procedente de la cola de cada uno de los animales. Las muestras de ADN fueron digeridas con el enzima de restricción *Bgl*II y se hibridaron las membranas con una sonda específica para el exón 7 del gen de FK de rata. Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 5 Kb correspondiente al gen endógeno de la FK y una banda de 0,91 Kb característica del transgén, cuya presencia sólo era detectable en los ratones transgénicos.

II.2. *Análisis de la expresión del gen quimérico*

Se pudo comprobar la expresión del gen quimérico en el hígado de los ratones transgénicos mediante el análisis del ARN total extraído del hígado de los animales control y transgénicos, tanto en condiciones de alimentación como después de un ayuno de 20h. El ARN total se obtuvo empleando el método del isotiocianato [Chirwin et al. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299] y, a continuación, se separaron muestras de ARN (30 μg) en un gel de electroforesis de agarosa al 1 % que contenía formaldehído 2,2 M y se transfirió (*Northern blot*) a una membrana para su hibridación con una sonda de la fructoquinasa marcada con ^{32}P, empleándose como sonda el ADNc de la FK de rata. Para ello, se marcó dicha sonda con [α-^{32}P]dCTP siguiendo el método de *oligopriming* descrito por el fabricante. La actividad de la sonda de ADN fue de aproximadamente 10^9 cpm/μg ADN. Las membranas de transferencia se pusieron en contacto con películas Kodak XAR-5. Se observó un nivel de ARNm de FK más elevado en los ratones transgénicos que en los controles. No obstante, las diferencias observadas entre controles y transgénicos fueron mucho mayores en condiciones de ayuno, ya que el promotor de la PEPCK se expresa principalmente en este estado.

II.3. *Análisis de los niveles de glucosa e insulina*

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones control y transgénicos para analizar los niveles de glucosa e insulina circulantes.

La concentración de glucosa se determinó mediante el sistema Glucometer Elite^{TM} de Bayer. La insulina se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) con el kit comercial de INSULIN-CT de CIS Biointernational, Francia.

Se observó que los ratones transgénicos presentaban unos niveles de glucemia e insulinemia normales respecto a los controles. Estos resultados indican que la expresión de fructoquinasa por parte del hígado en estos animales transgénicos es compatible con la supervivencia normal del animal.

II.4. *Análisis de la actividad fructoquinasa en hígado*

Se determinó la actividad FK en hígado tanto en animales control como transgénicos. Se observó que, en condiciones de ayuno, los animales transgénicos mostraban un incremento de 2 a 3 veces en la actividad FK respecto a los controles.

II.5. *Análisis de la toxicidad aguda de la fructosa*

Se realizó un estudio de toxicidad aguda de la fructosa con el fin de determinar si los animales transgénicos presentaban intolerancia a la fructosa. En dicho estudio, tras una inyección aguda de fructosa por vía intravenosa, se observó en hígado un incremento de 3 a 5 veces en el contenido de fructosa-1-fosfato (F-1-P), así como una disminución de más del 50 % en la concentración de ATP respecto a los controles. Estos resultados indicaban que los transgénicos presentan intolerancia a la fructosa, debido a la incapacidad de la aldolasa B de contrarestar el incremento de F-1-P.

REIVINDICACIONES

1. Gen quimérico **caracterizado** por el hecho de que comprende un promotor unido al gen o al ADNc de la fructoquinasa, insertándose, dicho gen quimérico, en una célula hepática, lo que permite la expresión de fructoquinasa.

2. Gen quimérico según la reivindicación 1, donde dicho promotor es el promotor de la PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa).

3. Vector de expresión que comprende un gen quimérico según la reivindicación 1 ó 2.

4. Célula hepática transformada por un vector de expresión según la reivindicación 3.

5. Animal transgénico **caracterizado** por el hecho de que comprende un gen quimérico según la reivindicación 1, desarrollando, dicho animal transgénico, alteraciones asociadas a la intolerancia hereditaria a la fructosa tras la administración de fructosa, sorbitol o sacarosa.

6. Animal transgénico según la reivindicación 5, donde dicho animal transgénico es un mamífero.

7. Animal transgénico según la reivindicación 5 ó 6, donde dicho animal transgénico es un ratón.

8. Tejido o tipo celular originado a partir de un animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

9. Utilización de un gen quimérico según la reivindicación 1 para la obtención de animales transgénicos.

10. Utilización de un gen quimérico según la reivindicación 9, donde dichos animales transgénicos son ratones.

11. Utilización de un animal transgénico según la reivindicación 9 ó 10 en el desarrollo de aproximaciones terapeúticas para la intolerancia hereditaria a la fructosa.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 190 311

(21) N.° solicitud: 200002221

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **31.08.2000**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{7}:** C12N 15/52, 15/62, 15/79, A61K 48/00, A01K 67/027

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HAYWARD B.E. et al. Structure and alternative splicing of the ketohexokinase gene. Eur. J. Biochem., Octubre 1998, Vol. 257, N° 1, páginas 85-91.	1-11
Y	WO 9525169 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA BARCELONA) 21.09.1995, ejemplos; reivindicaciones.	1-11
A	US 5075229 A (RICHARD W. HANSON y MARY Mc GRANE) 24.12.1991	1-11

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

[X] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
24.06.2003	J. Manso Tomico	1/1