



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 257 902**

② Número de solicitud: 200302044

⑤ Int. Cl.

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **29.08.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.08.2006

⑦ Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Universidad Autónoma de Madrid**

⑦ Inventor/es: **Bosch Tubert, Fatima;
Pujol Altarriba, Anna;
Riu Pastor, Efren;
García Martínez, Miquel y
Feliu Albiñana, Juan Emilio**

⑦ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑤ Título: **Modelo de animal transgénico para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.**

⑤ Resumen:

Modelo de animal transgénico para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Dicho animal transgénico no humano contiene una mutación dirigida en el gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

El procedimiento para producir el animal transgénico no humano comprende las etapas de: i) crear una construcción de recombinación; ii) transfectar dicha construcción de recombinación en células pluripotenciales; iii) seleccionar las células transfectadas de la etapa (ii) que expresan dicho(s) marcador(es); iv) introducir dicha célula transfectada en un embrión en estadio de blastocito; v) transferencia de los blastocitos manipulados a hembras receptoras para obtener ratones quimera; vi) cruce de los animales quimera con animales control para producir un animal heterocigoto para la mutación; y vii) cruce de los animales heterocigotos obtenidos en (vi) para obtener animales homocigotos para la mutación en el gen que codifica para la PFK1 muscular.

Dicho modelo de animal transgénico se puede utilizar en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades como la glucogenosis, la diabetes tipo II y el Alzheimer.

ES 2 257 902 A1

DESCRIPCIÓN

Modelo de animal transgénico para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con las enfermedades asociadas a la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular y a la glucogenosis muscular en particular.

10 La presente invención se refiere a un modelo de animal transgénico que permite el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas tanto de la glucogenosis como de otras enfermedades en las que se ve involucrada la PFK1 muscular.

Antecedentes de la invención

15 La 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1, E.C. 2.7.1.11) es una enzima tetramérica derivada de tres *loci* genéticos que codifican para las subunidades muscular (M), hepática (L) y plaquetas (P). La expresión de estos tres genes es variable dependiendo del tejido. En el músculo se expresa el tetrámero M4, en hígado y riñón se expresa el tetrámero L4 y en los eritrocitos se expresa tanto el tetrámero M4 como el L4 y las tres formas híbridas.

20 Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno, también denominadas glucogenosis, son enfermedades metabólicas debidas a deficiencias enzimáticas específicas que llevan a una alteración en la homeostasis normal del glucógeno. Dependiendo de la alteración molecular, las glucogenosis se clasifican en diferentes tipos, que van desde el tipo I hasta el tipo VIII. La glucogenosis tipo VII, también conocida como enfermedad de Tarui, se presenta en forma autosómica recesiva asociada a una deficiencia en la actividad de la enzima PFK-1 muscular. A pesar de que la incidencia de esta enfermedad en la población es muy baja, con unos 40-50 casos documentados, la incidencia real podría ser superior, ya que su variante más leve es difícil de conocer. El diagnóstico se realiza determinando la carencia de actividad PFK-1 en biopsias musculares.

30 La enfermedad se presenta con diferentes grados de severidad en su sintomatología. La mayoría de pacientes sufren fatiga muscular y calambres, vómitos y mioglobinuria al practicar ejercicio físico, de manera que se considera que son "intolerantes al ejercicio". Algunos pacientes también pueden sufrir otras alteraciones como: ictericia, gota o artritis. De las diferentes formas en las que se presenta la enfermedad, la infantil, que aparece durante el primer año de vida, es la más severa. Los niños desarrollan ceguera e importantes deficiencias respiratorias, cardíacas y problemas psicomotrices que llevan a la muerte del paciente antes de los cuatro años. Otros pacientes, desarrollan una forma de aparición tardía que se presenta con una debilidad muscular progresiva.

35 Los tejidos deficientes en la actividad PFK-1 no pueden metabolizar, por vía glucolítica, la glucosa procedente de la dieta o la glucosa-6-P derivada de la degradación de glucógeno. Como consecuencia, el músculo se ve imposibilitado de obtener suficiente ATP para mantener la capacidad contráctil. A la vez, se produce una acumulación de glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato y glucosa-1-fosfato. Este incremento de hexosas monofosfato lleva a la activación de la glucógeno sintasa que produce un aumento en la síntesis de glucógeno.

45 De esta manera, cuando se agota el ATP por la actividad muscular se produce una degradación acelerada de nucleótidos de adenina. Además, el incremento en hexosas monofosfato también lleva a un aumento en la producción de nucleótidos. Estos dos fenómenos provocan un aumento de las concentraciones sanguíneas de amonio, inosina e hipoxantina que, al ser metabolizadas en el hígado, producirán ácido úrico. El incremento en sangre de ácido úrico es el responsable de la aparición de la gota y de la artritis. Por otro lado, el bloqueo de la vía glucolítica en los eritrocitos produce una disminución de los niveles de 2,3-difosfoglicerato. Este descenso hace aumentar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, dando lugar a un aumento en la producción de eritrocitos. Esta producción compensa la hemólisis de manera que no se presenta anemia en los pacientes.

50 Como modelo animal, se ha utilizado, principalmente, una raza de perros (English springer spaniel) la cual desarrolla, de manera natural, una deficiencia parcial en la actividad de la PFK1 y presentan anemia hemolítica como consecuencia de dicha deficiencia en los hematíes y una leve patología muscular (Vora S *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;82(23):8109-13 1985; Skibild E *et al.*, J Small Anim Pract. Jun;42(6):298-300 2001).

55 También se ha propuesto como modelo de la enfermedad de Tarui (también conocida como glucogenosis tipo VII) en humanos la inhibición de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa mediante una inyección intraaórtica con yodoacetato a una rata (Brumback, Roger A., Journal of the Neurological Sciences, 48(3), 383-98, 1980).

60 En los últimos años, además, se han realizado diversas investigaciones que evidencian una relación entre los niveles de expresión/actividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa y enfermedades como la diabetes tipo II y el Alzheimer (Ristow M *et al.*, Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J Clin Invest.* Dec 1;100(11):2833-41. 1997; T. A. Lakka, *et al.*, A Quantitative Trait Locus on 7q31 for the Changes in Plasma Insulin in Response to Exercise Training: The HERITAGE Family Study Diabetes, June 1, 2003; 52(6): 1583 - 1587; Bigl M, *et al.*, Changes of activity and isozyme pattern of phosphofructokinase in the brains of patients with Alzheimer's disease, *J Neurochem.* 1996 Sep;67(3):1164-71; Bigl M, Eschrich K. Interaction of rat

brain phosphofructokinase with Alzheimer's beta A4-amyloid. *Neurochem Int.* 1995 Jan;26(1):69-75; Sims NR, *et al.*, Phosphofructokinase activity in the brain in Alzheimer's disease, *Ann Neurol.* 1987 May;21(5):509-10).

5 Sin embargo, el hecho de que la glucogenosis de tipo VII sea una de las menos frecuentes junto con la ausencia de un modelo animal transgénico con una patología muscular por deficiencia de la PFK-1 muscular, no ha permitido un estudio sistemático de la fisiopatología de esta enfermedad, ni la evaluación de las adaptaciones del músculo deficiente en PFK-1 ante una situación en la que se encuentra bloqueada la principal fuente de energía en condiciones anaerobias ni el estudio de la relación entre los niveles de expresión o actividad de la PFK-1 con otras enfermedades como son el Alzheimer y la diabetes tipo II.

10 Descripción resumida de la invención

15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un animal transgénico no humano que se caracteriza por el hecho de que dicho animal contiene una mutación dirigida en el gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una célula aislada o línea celular que se caracteriza por el hecho de que dicha célula o línea celular contiene una mutación dirigida en el gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

25 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de recombinación caracterizada por el hecho de que comprende:

- 30 i) dos regiones homólogas al gen codificante de la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular; y
- 35 ii) uno o más genes, diferentes entre sí, que permiten la selección de eventos de recombinación homóloga.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un animal transgénico no humano con una mutación dirigida en el gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende las etapas de:

- 45 (a) crear una construcción de recombinación, de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención,
- 50 (b) transfectar dicha construcción de recombinación en células pluripotenciales,
- 55 (c) seleccionar las células transfectadas de la etapa (b) que expresan dicho(s) marcador(es),
- 60 (d) introducir dicha célula transfectada en un embrión en estadio de blastocito,
- 65 (e) transferencia de los blastocitos manipulados a hembras receptoras para obtener ratones quimera,
- (f) cruce de de los animales quimera con animales control para producir a un animal heterocigoto para la mutación,
- (g) cruce de los animales heterocigotos obtenidos en (f) para obtener animales homocigotos para la mutación en el gen que codifica para la PFK1 muscular.

70 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la glucogenosis muscular que comprende:

- 75 (i) administrar un agente a evaluar en un animal de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;
- 80 (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora de la glucogenosis muscular.

85 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la diabetes tipo II que comprende:

- 90 (i) administrar un agente a evaluar en un animal de acuerdo el primer aspecto de la invención;
- 95 (ii) determinar si el agente es efectivo para el tratamiento de la diabetes tipo II.

100 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a Alzheimer que comprende:

- 105 (i) administrar un agente a evaluar en un animal de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;
- 110 (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora del Alzheimer.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la glucogenosis muscular.

5 En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la diabetes tipo II.

10 En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas en el tratamiento del Alzheimer.

Descripción de los dibujos

15 Figura 1: corresponde a un esquema de obtención del vector de recombinación descrito en el Ejemplo de más abajo. En dicho esquema se indican las dianas de restricción más relevantes tanto del clon λ PFKM14 como de los plásmidos utilizados en las diferentes etapas de la construcción del vector de recombinación.

20 Figura 2: mapa parcial del gen de la PFK-1M (tipo salvaje), del vector de recombinación pPNT/PFK-1M KO linealizado y del alelo recombinante (KO) resultado de la recombinación homóloga. Las sondas utilizadas se indican como los fragmentos 1-*Xho* y 1-*Hind*-III (5') y 2-*Pst* y 1-*Sall* (3'). Los cebadores utilizados para la PCR fueron a) PFK-Fw i b) PFK-Rev c) TS-Neo.

25 Figura 3: A) Análisis por Northern Blot de RNA total de músculo esquelético de los ratones. B) Actividad PFK-1M en extractos musculares de los ratones. La actividad se representa como tanto por ciento respecto al valor de los animales control. La barrera de color blanco, representa el control; la barra de color gris representa la actividad en heterocigotos y la barra de color negro representa la actividad en homocigotos.

Descripción detallada de la invención

30 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un animal transgénico no humano que se caracteriza por el hecho de que dicho animal contiene una mutación dirigida en el gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

35 La isoforma muscular de la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1 M) está codificada por un gen de aproximadamente 35 Kb localizado en el cromosoma 15 murino o en el 12 humano. La secuencia de dicho gen se puede consultar en cualquier base de datos asequible para cualquier experto en la materia, como la Locus (I.D. 18642). Brevemente, el gen codificante de la PFK1-M está constituido por 22 exones que dan lugar a un RNA mensajero de 2781 pares de bases. La región 5' del gen presenta un putativo sistema de doble promotor similar al descrito en el gen humano: uno distal situado entre -4800 y -3600 pb, que se expresaría de manera constitutiva, y otro proximal, entre -335 y +99, que presenta motivos CAAT, TATA y M-CAT, que contribuirían a la expresión específica muscular. Este sistema da lugar a un mensajero que presenta "splicing" alternativo para generar tres transcritos diferentes. La expresión diferencial de estos transcritos se ha relacionado con los procesos de diferenciación muscular.

45 En la presente invención, por "mutación dirigida" se entiende una modificación en la secuencia del gen codificante de la PFK1 muscular, consistiendo, dicha modificación, en una inserción, delección o sustitución de un nucleótido o una región de dicho gen y llevándose a cabo dicha modificación mediante la utilización de técnicas y protocolos bien conocidos para un experto en la materia, que incluyen pero no se limitan a, "knock-out" y "knock-in", entre otros.

50 En una realización preferida, el animal transgénico no humano del primer aspecto de la invención se caracteriza por el hecho de que dicha mutación dirigida da lugar a una reducción o supresión de la expresión del gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

55 En la presente invención por "reducción o supresión de la expresión del gen de la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular" se entiende la pérdida, total o parcial, de la expresión del gen que codifica para la PFK1-M como consecuencia de la mutación dirigida generada en dicho gen, produciéndose la PFK1-M en unos niveles de concentración bajos o nulos respecto a un animal que no comprenda disrupciones en la secuencia de dicho gen.

60 En otra realización preferida, el animal transgénico no humano del primer aspecto de la invención se caracteriza por el hecho de que dicha mutación dirigida da lugar a una reducción o supresión de la actividad de la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

65 En la presente invención por "reducción o supresión de la actividad de la PFK1 muscular" se entiende la pérdida, total o parcial, de actividad de la PFK1-M codificada por el gen que comprende una mutación.

Ventajosamente, el animal transgénico no humano de la presente invención se caracteriza por el hecho de que dicha mutación es homocigótica, consistiendo, preferiblemente, dicha mutación en la eliminación de los inicios de transcripción y traducción, así como del primer exón del gen codificante de la PFK1-M.

ES 2 257 902 A1

Dicha mutación homocigótica da lugar a una supresión de la expresión del gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

5 En una realización de la invención, el animal transgénico no humano se caracteriza por el hecho de que dicha mutación dirigida es heterocigótica.

Dicha mutación heterocigótica da lugar a una reducción de la expresión del gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

10 En otra realización de la invención, el animal transgénico no humano se caracteriza por el hecho de que dicho animal presenta un fenotipo de glucogenosis muscular, preferiblemente de glucogenosis muscular tipo VII.

15 En todavía otra realización de la invención, el animal transgénico no humano se caracteriza por el hecho de que dicho animal presenta un fenotipo de diabetes tipo II.

En todavía aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, dicho animal transgénico no humano es un mamífero, preferiblemente un ratón.

20 El animal transgénico del primer aspecto de la invención permite continuar con los estudios moleculares relacionados con las alteraciones que se producen no únicamente en el músculo esquelético sino que también en otros tejidos (corazón, cerebro, bazo, sangre, páncreas) que se pueden ver afectados por la expresión del gen de la PFK1-M.

25 Los inventores de la presente invención han diseñado un animal transgénico no humano que permitirá conocer mejor la patología de los pacientes que sufren de enfermedades relacionadas con la expresión y/o actividad de la PFK1-M, no únicamente referidas a las glucogenosis musculares y, además, permitirá el estudio de la relación existente entre la PFK1-M y la diabetes tipo II o el Alzheimer.

30 Otro aspecto ventajoso del animal transgénico de la presente invención respecto a los animales modelo utilizados hasta la fecha (de la raza English springer spaniel), a parte del precio, es que se pueden controlar los diferentes factores que pueden afectar a la expresión y/o actividad de la enzima PFK1-M, mediante una modificación particular (mutación dirigida) de la secuencia del gen que codifica para dicha enzima. Los modelos animales (perros de la raza English springer spaniel) utilizados hasta la fecha, para el estudio de la glucogenosis asociada con la PFK1-M, desarrollan dicha patología como consecuencia de una mutación natural (es decir, no provocada "*in vitro*") en el gen que codifica para la PFK1-M, con el inconveniente de que este modelo puede presentar otras alteraciones no controladas y/o identificadas, las cuales pueden dificultar o interferir en el estudio de enfermedades asociadas con los niveles de la PFK1-M.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una célula aislada o línea celular que se caracteriza por el hecho de que dicha célula o línea celular contiene una mutación dirigida en el gen de la PFK1 muscular.

Preferiblemente, dicha célula aislada o línea celular es una célula pluripotencial o una célula pluripotencial embrionaria.

45 En una realización del segundo aspecto de la presente invención, dicha célula aislada o línea celular se caracteriza por el hecho de que dicha mutación consiste en la eliminación de los inicios de transcripción y traducción, así como el primer exón del gen.

50 En otra realización del segundo aspecto de la presente invención, dicha célula aislada o línea celular se caracteriza por el hecho de que dicha mutación da lugar a una reducción o supresión de la actividad de la enzima PFK1 muscular.

Preferiblemente, la célula aislada o línea celular, del segundo aspecto de la invención se caracteriza por el hecho de que procede de un animal transgénico no humano de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

55 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de recombinación que se caracteriza por el hecho de que comprende:

- i) dos regiones homólogas al gen codificante de la PFK1 muscular; y
- 60 ii) uno o más genes, diferentes entre sí, que permiten la selección de eventos de recombinación homóloga.

65 En la presente invención, por "regiones homólogas al gen codificante de la PFK1 muscular" se entiende fragmentos de ADN que presentan una homología de por lo menos el 90% respecto a la secuencia del gen que codifica para la PFK1-M (Locus I.D. 18642, MGI:97548).

Se debe de tener en cuenta que cuanto mayor homología presenten las regiones (i), tendrá lugar una mayor frecuencia de recombinación de homóloga.

ES 2 257 902 A1

En una realización del tercer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de recombinación que se caracteriza por el hecho de que dichos genes de selección (ii) se seleccionan entre: timidina quinasa, neomicina, zeocina y higromicina.

5 En otra realización del tercer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de recombinación, que se caracteriza por el hecho de que se localiza un gen de selección entre las dos regiones homólogas (i), y un segundo gen de selección localizado en el extremo de una de las regiones de homología.

10 En la presente invención, por “en el extremo de una de las regiones homólogas” se entiende la región de la secuencia de DNA homóloga opuesta al lugar donde esta se une al primer gen de selección.

15 En aún otra realización del tercer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de recombinación que se caracteriza por el hecho de que las dos regiones (i) tienen una homología del 100% respecto al gen codificante de la PFK1 muscular y los genes de selección (ii) son neomicina y timidina quinasa.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un animal transgénico no humano con una mutación dirigida en el gen de la PFK1 muscular de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende las etapas de:

- 20 (a) crear una construcción de recombinación, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención,
- (b) transfectar dicha construcción de recombinación en células pluripotenciales,
- 25 (c) seleccionar las células transfectadas de la etapa (b) que expresan dicho(s) marcador(es),
- (d) introducir dicha célula transfectada en un embrión en estadio de blastocito,
- (e) transferencia de los blastocitos manipulados a hembras receptoras para obtener ratones quimera,
- 30 (f) cruce de los animales quimera con animales control para producir a un animal heterocigoto para la mutación,
- (g) cruce de los animales heterocigotos obtenidos en (f) para obtener animales homocigotos para la mutación en el gen que codifica para la PFK1 muscular.

35 Preferiblemente, en la etapa (b) se lleva a cabo la transfección mediante electroporación.

40 Las técnicas que se pueden utilizar para cada una de las etapas (a) a (g) son las utilizadas de manera rutinaria por los expertos en la materia.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la glucogenosis muscular que comprende:

- 45 (i) administrar un agente a evaluar en un animal de acuerdo con el primer aspecto de la invención;
- (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora de la glucogenosis muscular.

50 En una realización del quinto aspecto de la invención, dicho procedimiento determina la efectividad de un agente contra la glucogenosis tipo VII.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la diabetes tipo II que comprende:

- 55 (i) administrar un agente a evaluar en un animal de acuerdo con el primer aspecto de la invención;
- (ii) determinar si el agente es efectivo para el tratamiento de la diabetes tipo II.

60 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a Alzheimer que comprende:

- (i) administrar un agente a evaluar en un animal con el primer aspecto de la invención;
- (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora del Alzheimer.

65 En la presente invención, por “agente” se entiende un compuesto químico de origen natural o sintético, con una actividad terapéutica génica o una actividad terapéutica farmacológica. Los conceptos de terapia génica así como el de terapia farmacológica son bien conocidos para un experto en la materia.

ES 2 257 902 A1

En la presente invención, por “es efectivo en la mejora” se entiende que al administrar el agente remiten, total o parcialmente, los síntomas asociados con una determinada patología.

5 En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, según el primer aspecto de la invención, en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la glucogenosis muscular, preferiblemente de la glucogenosis muscular tipo VII.

10 En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, según el primer aspecto de la invención, en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo II.

En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico no humano, según el primer aspecto de la invención, en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del Alzheimer.

15 A modo ilustrativo y no limitativo, se incluyen los siguientes ejemplos de realización de la presente invención.

Ejemplo

20 1. Clonación y caracterización del gen de la PFK-1 muscular de ratón

1.1. Obtención de clones genómicos de la PFK-1 muscular

25 Dado que el vector de recombinación tenía que incluir dos regiones de homología, necesitábamos obtener clones genómicos de la PFK-1M. Con esta finalidad utilizamos una genoteca de la cepa de ratón 129Sv. Se escogió esta genoteca debido a que las células ES más ampliamente utilizadas para la obtención de ratones KO son de esta cepa. Así podríamos obtener el máximo de homología entre el vector de recombinación y el gen endógeno. Esto es importante para incrementar la frecuencia de recombinación homóloga.

30 1.2. Obtención de sondas de cDNA de la PFK1-M

Nuestra estrategia consistía en producir una mutación basada en la eliminación, mediante recombinación homóloga, de los inicios de transcripción y traducción así como del primer exon del gen de la PFK-1M para eliminar su expresión. Con esta finalidad generamos sondas específicas del gen de la PFK-1M que hibridarían con estas regiones. Así, obtuvimos RNA total de músculo de ratón y se realizaron diferentes RT-PCR utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias parciales del gen de ratón publicadas (*Nakajima H et al. 1994, Biochemical J. 303:449-453*). Estos oligonucleótidos fueron:

PS3: SEC. ID N°: 1;

40 RM7: SEC. ID. N°: 2;

AMP: SEC. ID N°: 3; y

45 P650: SEC. ID N°: 4.

Dichos cebadores incorporaban en sus extremos secuencias correspondientes a dianas de encimas de restricción para facilitar su posterior clonage. Así se obtuvieron 4 productos de PCR de 180, 226, 668, y 714 pb que correspondían a las 4 combinaciones de los cebadores que amplificaban la región 5' del cDNA. Decidimos utilizar como sonda para el cribage de la librería genómica el fragmento de 226 pb producto de la amplificación con los cebadores PS3 y AMP. Este fragmento fue purificado y clonado en un plásmido utilizando las dianas de restricción introducidas en los cebadores. Posteriormente este fragmento fue secuenciado y pudimos confirmar que correspondía a la región 5' no traducida más los dos primeros exones del gen de la PFK-1M. Por lo tanto, esta sonda nos permitiría la identificación de los clones genómicos que contenían esta región.

55 1.3. Cribaje de la genoteca y obtención de clones

A continuación se plaqueó la genoteca y se realizó el cribaje con la sonda que habíamos obtenido siguiendo técnicas ampliamente documentadas (Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., NY, 2001). Se realizaron cuatro cribajes consecutivos hasta conseguir aislar tres clones que hibridaban con la sonda. Estos clones se denominaron: λ PFKM1 (16Kb), λ PFKM10 (16Kb), λ PFKM14 (17Kb). Para facilitar su posterior amplificación y análisis estos fragmentos fueron subclonados en diferentes plásmidos.

65 1.4. Mapeo de restricción y identificación de los clones obtenidos

Los tres clones fueron mapeados mediante análisis de restricción utilizando múltiples enzimas de restricción para obtener la máxima información posible, así como para facilitar la posterior obtención de los fragmentos que posteriormente se utilizarán como brazos 5' y 3' del vector de recombinación. Los fragmentos que podían incluir las dianas

de interés fueron subclonados en plásmidos para realizar un análisis más exhaustivo. Paralelamente, se obtuvieron por RT-PCR sondas específicas para diferentes exones así como para la región promotora. Con estas sondas se realizó un análisis por *Southern blot* para caracterizar mejor los clones. El mapeo de estos clones permitió identificar en el clon λ PFKM14 la región promotora con los inicios de transcripción y traducción y el primer exón coincidiendo con los mapas de los fragmentos publicados del gen de ratón (Gekakis N and Sul HS, 1994, *Biochemistry* 33:1771-1777) (Figura 2). Para confirmar la identidad del clon λ PFKM14, se analizó mediante la técnica de secuenciación cíclica con 4 fluorocromos un fragmento EcoRI-EcoRI de 198(SEC. ID N°: 5) pb que correspondía al primer exón del gen de la PFK-1M así como parte del intrón posterior. Esta secuencia se correspondía con la ya publicada, confirmando la identidad del clon (Nakajima H *et al.* 1994, *Biochemical J.* 303:449-453). Así, se utilizó este clon para obtener las regiones de homología necesarias para realizar el vector de recombinación.

2. Construcción del vector de recombinación

La construcción del vector de recombinación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., NY, 2001) y como base el plásmido pPNT (cedido por el Dr. Tony Pawson (Samuel Lunefeld Research Institute, Toronto, Canadá)). Este vector incorpora el gen de resistencia a neomicina eucariota (Neo) así como el gen de la Timidina Quinasa (TK). Estos genes permitirían realizar una doble selección, positiva y negativa, para los eventos de recombinación homóloga.

La construcción del vector de recombinación se inició a partir de los diferentes fragmentos que habíamos subclonado del clon λ PFKM14. Decidimos utilizar un fragmento XhoI-XbaI de 3,5Kb para la obtención del brazo 5' y un fragmento EcoRI/Sal I de 1,4 Kb para el brazo 3'. Después de varios pasos de subclonación en diferentes plásmidos intermedios se obtuvo el vector de recombinación pPNT/PFK1MKO que se utilizó posteriormente para la mutación del gen de la PFK-1M (Figura 1). Este vector incorporaba dos regiones de homología que permitirían dirigir la recombinación de manera que se eliminaría una región 3' del promotor que incluye el inicio de transcripción, así como el primer exón con el inicio de traducción del gen de la PFK-1M. Con esto esperábamos poder reducir o anular la expresión del gen y la actividad de la proteína.

3. Electroporación e identificación de los clones de células ES recombinantes.

3.1. Cultivo y selección de los clones de células ES recombinantes

Una vez obtenido el vector de recombinación, este se introdujo en células ES para realizar la recombinación homóloga y la posterior selección, siguiendo técnicas ampliamente descritas en la bibliografía (Joyner AL. *Gene targeting : a practical approach*. 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, 2000). Con esta finalidad, las células ES fueron electroporadas en presencia del vector de recombinación linearizado. Posteriormente, se sometieron las células ES a selección positiva con G418 y negativa con ganciclovir. La presencia de G418 en el medio permitía seleccionar los clones que habían incorporado el gen de resistencia a la neomicina. Los clones que habían integrado el vector de manera no homóloga, también habían integrado el gen de la timidina quinasa, por lo que esta catalizaría la conversión del ganciclovir hasta un producto citotóxico que produciría la muerte de estas células. Esta estrategia permite el enriquecimiento del cultivo en eventos de recombinación homóloga.

3.2. Análisis de los clones seleccionados

A continuación se aislaron los clones que superaron el proceso de doble selección y se amplificaron. Para comprobar si habían incorporado la modificación en el gen de la PFK-1M se obtuvo ADN genómico de estos clones. Este análisis se realizó utilizando la técnica de *Southern blot* con sondas específicas que nos permitían diferenciar los clones en los que se había producido la recombinación homóloga. Dos de los clones identificados se utilizaron para ser inyectados en blastocitos de ratón.

4. Obtención de ratones quimeras y knock-out del gen de la PFK1-M

La obtención de ratones quimera se realizó mediante la técnica de microinyección de células ES en blastocito. Esta técnica es la metodología más utilizada y se encuentra ampliamente descrita (Joyner AL. *Gene targeting: a practical approach*. 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, 2000).

4.1. Microinyección de los clones mutados en blastocitos de ratón

Para obtener embriones se cruzaron hembras de la cepa C57B16 (donadoras de blastocitos compradas a Charles River Laboratories) con machos de la misma cepa. Estas hembras fueron sacrificadas 3,5 días después de la fecundación para obtener los embriones en estadio de blastocisto del útero.

Después de ser amplificados, los clones seleccionados fueron tripsinizados con el fin de obtener células aisladas que fueron microinyectadas en el blastocelo de los embriones obtenidos (15 células ES/blastocisto aproximadamente). Los blastocitos que superaron la inyección fueron transferidos al útero de hembras CD1 (compradas a Charles River Laboratories) pseudogestantes de 2,5 días (obtenidas tras haber sido cruzadas con machos vasectomizados) para que llevaran a cabo su gestación.

4.2. *Obtención de ratones quimeras*

A los 17 días de la transferencia, las hembras receptoras parieron. Los embriones que habían incorporado células modificadas dieron lugar a ratones quimera, caracterizados por proceder tanto del embrión de la cepa C57B16 como de las células ES de la cepa 129/Sv manipuladas genéticamente.

4.3. *Obtención de animales knock-out*

La quimeras obtenidas se cruzaron con hembras de la cepa C57/B16 para identificar qué animales eran capaces de transmitir la mutación a la descendencia. El análisis de esta descendencia mediante la técnica de *Southern blot* nos permitió identificar los animales que habían incorporado la modificación en su genoma. Dado el carácter heterocigoto de la mutación en estos animales, posteriormente se realizaron cruces entre ellos para conseguir obtener los animales en homocigosis. Estos animales fueron analizados confirmando la reducción de los niveles de expresión y de actividad PFK-1M en los animales heterocigotos y la supresión de los mismos en los animales homocigotos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Construcción de recombinación **caracterizada** por el hecho de que comprende como esqueleto un plásmido pPNT y en la dirección 5' a 3':
- a) una diana única NotI;
 - 10 b) un brazo 5' que corresponde a un fragmento genómico XhoI/XhoI de 3,5 Kb obtenido a partir del plásmido pTX5';
 - c) un fragmento de 1,3 kb correspondiente al gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor de la Fosfoglicerato Quinasa I;
 - 15 d) un brazo 3' que corresponde a un fragmento genómico EcoRI/SalI de 1,4 kb clonado con las dianas XbaI/Asp178; y
 - e) un fragmento de 2,8 kb correspondiente al gen de Timidina Quinasa bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa 1.
- 20 2. Animal transgénico no humano **caracterizado** por el hecho de que dicho animal contiene una construcción de recombinación según la reivindicación 1.
3. Animal transgénico no humano según la reivindicación 2 **caracterizado** por el hecho de que dicha construcción da lugar a una reducción o supresión de la expresión del gen que codifica para la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.
- 25 4. Animal transgénico no humano según la reivindicación 2 **caracterizado** por el hecho de que dicha construcción da lugar a una reducción ó supresión de la actividad de la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.
- 30 5. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dicha mutación es homocigótica.
6. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dicha mutación es heterocigótica.
- 35 7. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 5, **caracterizado** por el hecho que la mutación consiste en la eliminación de los inicios de transcripción y traducción, así como el primer exón del gen.
- 40 8. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 **caracterizado** por el hecho de que dicho animal presenta un fenotipo de glucogenosis muscular.
9. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 **caracterizado** por el hecho de que dicho animal presenta un fenotipo de diabetes tipo II.
- 45 10. Animal transgénico no humano según la reivindicación 9 **caracterizado** por el hecho de que dicho animal presenta un fenotipo de glucogenosis muscular tipo VII.
11. Animal transgénico no humano, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, **caracterizado** por el hecho de que es un mamífero.
- 50 12. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 11, **caracterizado** por el hecho de que es un ratón.
- 55 13. Célula aislada o línea celular **caracterizada** por el hecho de que dicha célula o línea celular contiene una construcción de recombinación según la reivindicación 1.
14. Célula aislada o línea celular, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que dicha célula es una célula pluripotencial o una célula pluripotencial embrionaria.
- 60 15. Célula aislada o línea celular, según las reivindicaciones 13 a 14, **caracterizada** por el hecho de que dicha construcción de recombinación da lugar a una mutación consiste en la eliminación de los inicios de transcripción y traducción, así como el primer exón del gen.
- 65 16. Célula aislada o línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 **caracterizada** por el hecho de que dicha mutación da lugar a una reducción ó supresión de la actividad de la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa muscular.

ES 2 257 902 A1

17. Célula aislada o línea celular, según las reivindicaciones 13 a 16, **caracterizada** por el hecho de que dicha célula aislada o línea celular procede de un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

5 18. Procedimiento para producir un animal transgénico no humano con una mutación dirigida en el gen de la 6-fosfofructo-1-quinasa muscular según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, que comprende las etapas de:

- (i) crear una construcción de recombinación, según la reivindicación 1,
- 10 (ii) transfectar dicha construcción de recombinación en células pluripotenciales,
- (iii) seleccionar las células transfectadas de la etapa (ii) que expresan dicho(s) marcador(es),
- (iv) introducir dicha célula transfectada en un embrión en estadio de blastocito,
- 15 (v) transferencia de los blastocitos manipulados a hembras receptoras para obtener ratones quimera,
- (vi) cruce de los animales quimera con animales control para producir un animal heterocigoto para la mutación,
- 20 (vii) cruce de los animales heterocigotos obtenidos en (vi) para obtener animales homocigotos para la mutación en el gen que codifica para la PFK1 muscular.

19. Procedimiento para producir un animal transgénico no humano según la reivindicación 18, **caracterizado** por el hecho de que en la etapa (ii) se lleva a cabo la transfección mediante electroporación.

25 20. Procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la glucogenosis muscular que comprende:

- (i) administrar un agente a evaluar a un animal según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12;
- 30 (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora de la glucogenosis muscular.

21. Procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a la diabetes tipo II que comprende:

- (i) administrar un agente a evaluar a un animal según la reivindicación 1;
- 35 (ii) determinar si el agente es efectivo para el tratamiento de la diabetes tipo II.

22. Procedimiento para evaluar la efectividad de un agente frente a Alzheimer que comprende:

- (i) administrar un agente a evaluar a un animal según la reivindicación 1;
- 40 (ii) determinar si el agente es efectivo en la mejora del Alzheimer.

23. Procedimiento según la reivindicación 20 **caracterizado** por el hecho de que se evalúa la efectividad de dicho agente para la glucogenosis muscular tipo VII.

24. Utilización de un animal transgénico no humano según la reivindicación 1 en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la glucogenosis muscular.

50 25. Utilización de un animal transgénico no humano según la reivindicación 1 en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo II.

26. Utilización de un animal transgénico no humano según la reivindicación 1 en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del Alzheimer.

55 27. Utilización de un animal transgénico no humano según la reivindicación 24 para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la glucogenosis tipo VII.

60

65

Figura 1

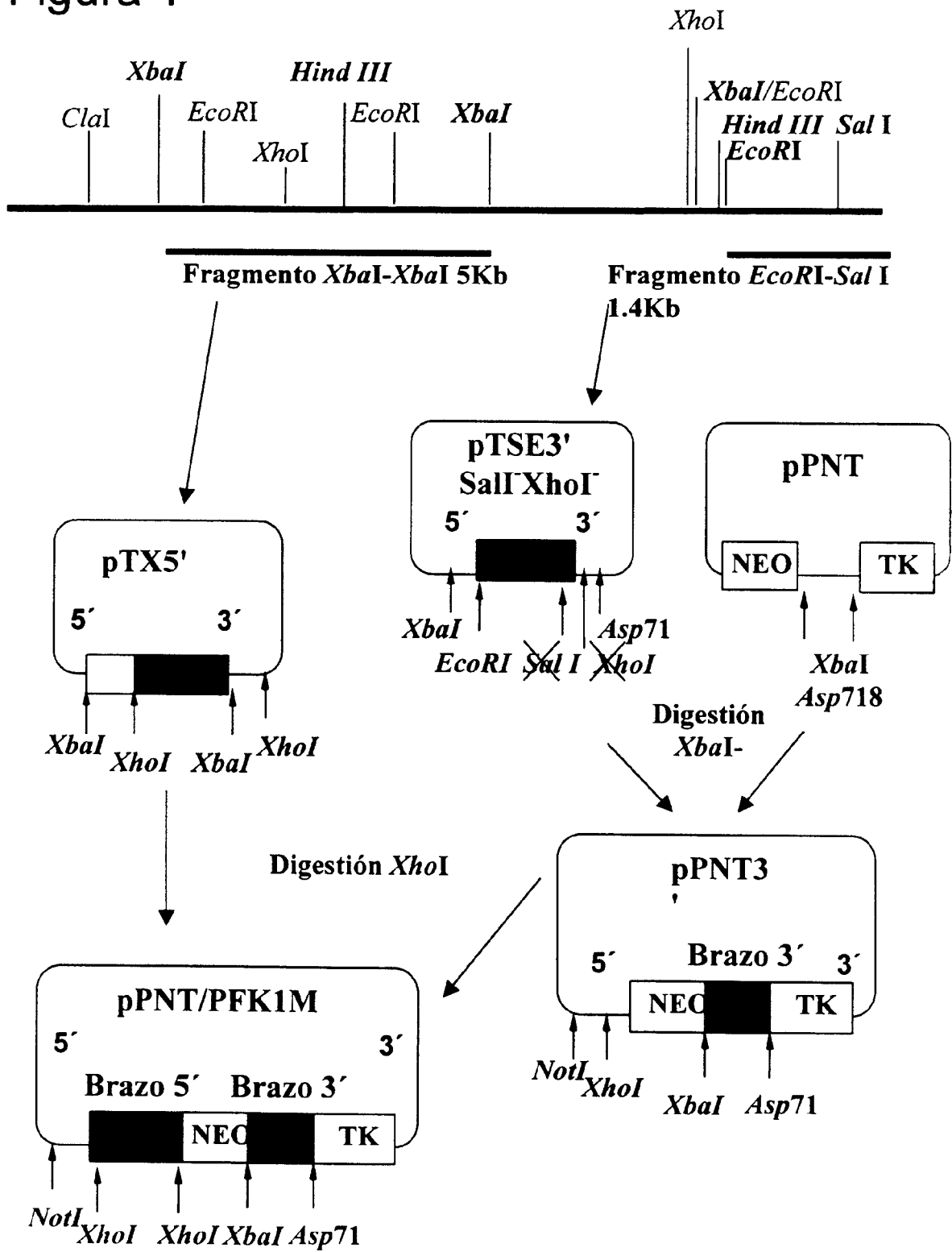


Figura 2

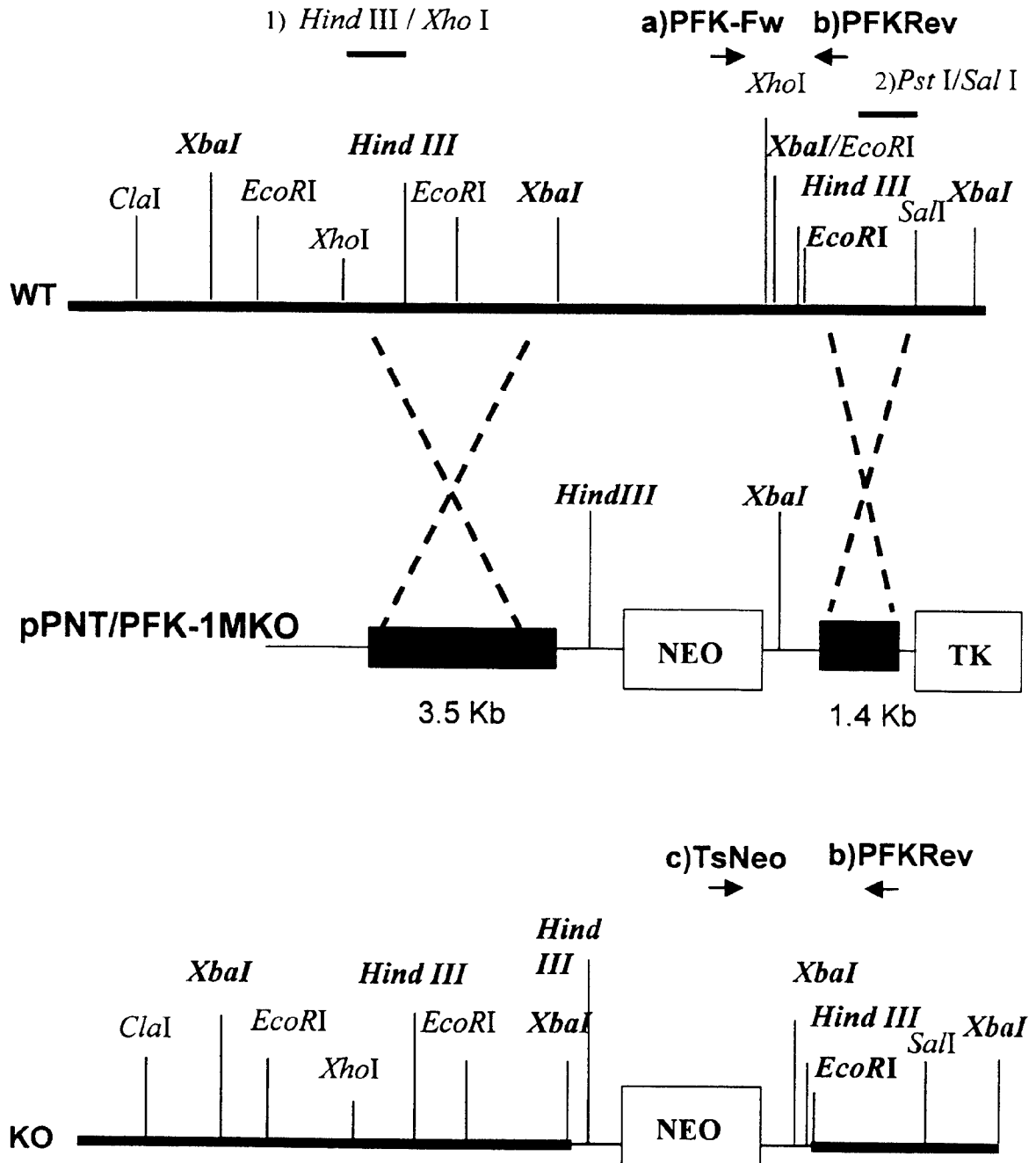


Figura 3A

+/+ +/+ +/- +/- -/- -/-

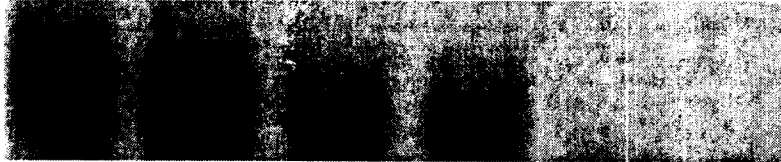
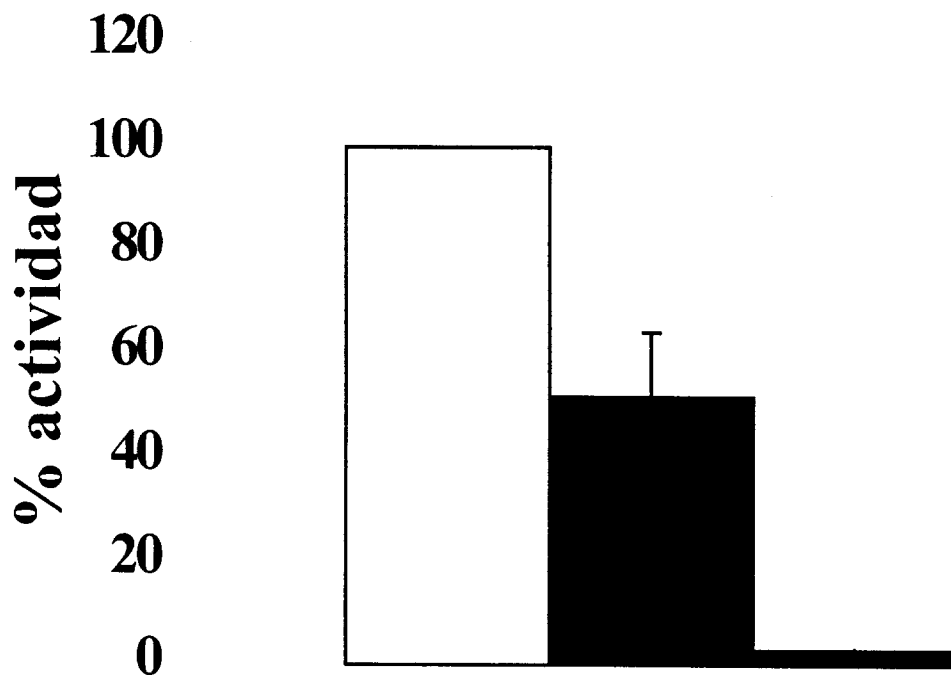


Figura 3B

Actividad PFK-1



ES 2 257 902 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

5 <120> MODELO DE ANIMAL TRANSGÉNICO PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS APROXIMACIONES
TERAPÉUTICAS

10 <130> P-157529

<140>

<141>

15 <160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC .ID. N°: 1

30 <400> 1

gcgtcgacaa tctgcaagaa agcag

25

35 <210> 2

<211> 28

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:SEC ID. N°: 2

45 <400> 2

gcatcgatga cccatgaaga gcacatg

28

50 <210> 3

<211> 32

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. ID. N°: 3

60 <400> 3

acgaattcac catccaccag gccttgtaa cc

32

65 <210> 4

<211> 35

ES 2 257 902 A1

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. ID. N°: 4

<400> 4

10

cagtcgacga cagagagggtg acaagggcca ggtat

35

<210> 5

15 <211> 198

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. ID N°: 5

<400> 5

25

gaattctaga gtggatcatg acccatgaag agcatcatgc agccaaaacc ctggggatcg 60

gcaaggccat cgccgtggtg acctctggtg gagatgccca aggtaagcag aggggacaga 120

30 agcatgggtg ctgtgaccct tgagtttctc gactcccaag totgtaggct ggaactattc 180

tcatgtaggt tcacactg 198

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 257 902

② N° de solicitud: 200302044

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.08.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01K 67/027** (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	STRAUSBERG R.L. et al. "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences" 4 abril 2001 EMBL Nucleotide Database [en línea] [recuperado el 29 de noviembre de 2004] Accession nº BC005526, Sequence Identification BC005526.1	1-27
A	CAPECCHI, M.R. "Altering the genome by homologous recombination" Science 1989, Vol. 244, part. 4910, páginas 1288-92.	1-27
A	THOMAS et al. "Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells." Cell, 1987, Vol. 51, nov 6, páginas 503-512.	1-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

03.05.2006

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1