



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 338 971**

⑫ Número de solicitud: 200802569

⑬ Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **08.09.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2010**

Fecha de la concesión: **01.03.2011**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **11.03.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.03.2011

⑲ Titular/es: **Fundación Centro Nacional de
Investigaciones Oncológicas Carlos III
Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Diéguez Hurtado, Rodrigo;
Ortega Jiménez, Sagrario;
Martínez Corral, Inés y
Olmeda Casadome, Daniel**

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Modelo animal para el estudio de la angiogénesis y linfangiogenesis *in vivo*.**

㉓ Resumen:

Modelo animal para el estudio de la angiogénesis y linfangiogenesis *in vivo*.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la biotecnología, y se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente cuyas células integran la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4, y que es capaz de reportar la expresión del gen Flt4 con un patrón idéntico al de la expresión del receptor VEGFR-3. Dicho mamífero no humano es útil en el estudio y evaluación de la progresión de las enfermedades que cursan con linfangiogenesis, angiogenesis y/o inflamación, así como para el ensayo de fármacos dirigidos a modular estos procesos, y por tanto, para el desarrollo de terapias antiangiogénicas, antitumorales y antimetastásicas.

ES 2 338 971 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Modelo animal para el estudio de la angiogénesis y linfoangiogénesis *in vivo*.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la biotecnología, y se refiere a un mamífero no humano modificado genéticamente cuyas células integran la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4, y que es capaz de reportar la expresión del gen Flt4 con un patrón idéntico al de la expresión del receptor VEGFR-3. Dicho mamífero no humano es útil en el estudio y evaluación de la progresión de las enfermedades que cursan con linfoangiogénesis, angiogénesis y/o inflamación, así como para el ensayo de fármacos dirigidos a modular estos procesos, y por tanto, para el desarrollo de terapias antiangiogénicas, antitumorales y antimetastásicas.

Estado de la técnica anterior

El gen Flt4 codifica para el receptor VEGFR-3, un receptor de membrana con actividad tirosina-quinasa que pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF A-D). Esta familia de receptores (VEGFR 1-3) tiene un patrón de expresión relativamente específico de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos y son reguladores muy importantes de los procesos de angiogénesis y neovascularización, ya que participan en el control de la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales.

El receptor VEGFR-3 comienza a expresarse en el ratón durante el desarrollo embrionario aproximadamente en el día 8 de gestación en los vasos sanguíneos primordiales, pero su expresión se restringe a los vasos linfáticos en el momento en que estos se desarrollan. De hecho, a día 12 del desarrollo embrionario la expresión de VEGFR-3 ya se detecta fundamentalmente en los vasos linfáticos (nuestros propios resultados). En el animal adulto, se ha descrito que en condiciones fisiológicas VEGFR-3 se expresa mayoritariamente en células endoteliales de los vasos linfáticos, y se considera un buen marcador de este tipo celular ya que al contrario que los receptores VEGFR-1 y -2, VEGFR-3 no se encuentra expresado en el endotelio de los vasos sanguíneos adultos, en condiciones fisiológicas.

Aunque específico de células endoteliales linfáticas, la expresión de VEGFR-3 en adulto es baja en condiciones basales. En el ratón se observa una caída dramática de los niveles de expresión entre animales jóvenes (1-5 semanas) y animales adultos (más de 6 semanas).

En general, existe una correlación tanto a nivel espacial como temporal entre la expresión de receptores de VEGF y procesos de angiogénesis. Así, en adultos la expresión de estos receptores se encuentra incrementada asociada a cicatrización tisular, inflamación, crecimiento tumoral y formación de metástasis, todos ellos, procesos que dependen de la formación y crecimiento de nuevos vasos a partir de los ya existentes.

Actualmente existe un modelo desarrollado por Xenogen Corporation basado en las señales de expresión del receptor VEGFR-2 (Flk1/KDR) (Zhang *et al.*, 2004. *Blood*, 103, 617-626. US 6,867,348). Se trata de un ratón genéticamente modificado en el cual dos fragmentos del gen Flk1 del ratón conteniendo las secuencias del promotor y enhancer respectivamente se han clonado en un plásmido que contiene la secuencia que codifica la enzima luciferasa. Esta construcción ha sido introducida en el genoma del ratón al azar mediante microinyección en pronúcleos de embriones de una célula.

Además se han desarrollado otros modelos reporter basados en las señales de expresión de otros genes cuya expresión es específica de células endoteliales. Dos líneas transgénicas han sido desarrolladas por diferentes laboratorios en las que el gen de la EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) se expresa bajo el control del promotor o promotor/enhancer de los receptores Tie1 (Iljin *et al.*, 2002. *Faseb J*, 16, 1764-1774) y Tie2 (Motoike *et al.*, 2000; *Genesis*, 28, 75-81) respectivamente. Tie1 y Tie2 se expresan durante el desarrollo embrionario en el ratón, en angioblastos y en células endoteliales. En el organismo adulto la expresión endógena de estos receptores en el endotelio se mantiene a niveles más bajos, y se induce en sitios de neovascularización como el ovario durante la formación del cuerpo lúteo y en procesos de cicatrización. Sin embargo, la expresión de genes reporter bajo el control de secuencias reguladoras de estos genes en los correspondientes modelos genéticamente modificados, como la línea Tie1-EGFP no se induce en el endotelio durante la neovascularización tumoral. Esta inducción sí se ha observado, sin embargo, al reemplazar parte de la secuencia del gen Tie1 endógena por el gen lacZ, tal y como se hizo para la generación del knockout de Tie1 (Puri *et al.*, 1995). La discrepancia entre el comportamiento de la línea knockout/knockin y la línea transgénica de Tie1 en cuanto a la activación de la expresión de Tie1 durante la angiogénesis tumoral refleja la limitación de las líneas transgénicas convencionales para reproducir fielmente la regulación de la expresión de los genes endógenos. Lo mismo se observa en una línea transgénica que expresa lacZ bajo el control del promotor de VEGFR-3, en la que no se reproduce por completo la expresión endógena del receptor (Iljin *et al.*, 2001).

Descripción de la invención

Los inventores han construido un modelo animal, un ratón modificado genéticamente mediante gene-targeting (*knock-in*) en el cual una proteína trazadora o *reporter* se expresara bajo el control de las señales de expresión del receptor VEGF-3. La expresión de este *reporter* puede ser monitorizada *in vivo* por técnicas no invasivas, lo que implica que se podría medir y cuantificar directamente en el ratón la angiogénesis asociada a diferentes procesos, tanto fisiológicos como patológicos a tiempo real.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un mamífero no humano genéticamente modificado, de ahora en adelante mamífero de la invención, cuyas células expresan la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen *Flt4* con un patrón idéntico a la expresión del receptor VEGFR-3, tanto en el espacio como en el tiempo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la expresión de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa comprende la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID NO: 1 en el animal o uno de sus ancestros.

La secuencia SEQ ID NO: 1 comprende las secuencias de IRES del virus de la encefalomiocarditis, la secuencia de la EGFP y de la luciferasa.

Las secuencias IRES (del inglés “*internal ribosome entry site*”) son secuencias nucleotídicas que permite la iniciación de la síntesis proteica en el medio de la traducción del marco abierto de lectura de un RNA mensajero (mRNA o ARNm). A diferencia del mecanismo más conocido de traducción proteica en organismos eucariontes que requiere una modificación previa en el extremo 5' del mRNA mensajero para el ensamblaje de la maquinaria de traducción, las secuencias IRES son reconocidas por el complejo de pre-iniciación 43S, de manera que pueden comenzar la traducción del RNA mensajero a pesar de carecer de modificación Cap en su extremo 5'. Estas secuencias han sido encontradas en miembros de las familias virales picornavirus, retrovirus y herpesvirus. Además, recientemente se han encontrado secuencias IRES en mRNA de organismos eucariontes, especialmente en proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, así como mecanismos apoptóticos. En el contexto de la presente invención se emplea como secuencias IRES, pero sin limitarnos, la secuencia IRES del virus de la encefalomiocarditis.

La EGFP según sus siglas en inglés (*enhanced green fluorescent protein*) es una mutación de una proteína (GFP) producida por la medusa *Aequorea sp.* (*A. victoria*, *A. aequorea*, *A. forskalea*) que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. Esta mutación (S65T) incrementa la fluorescencia, fotoestabilidad y posee unos picos de excitación y de emisión compatibles con los filtros de isotiocianato de fluoresceína (FITC), por lo que el gen que codifica esta proteína está aislado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador.

En esta memoria “luciferasa” se refiere a un término genérico que agrupa un grupo de enzimas capaces de producir bioluminiscencia en la naturaleza. La más conocida es la *firefly luciferase*, de *Photinus pyralis*. En las reacciones de luminiscencia la luz es producida por la oxidación de la luciferina (un pigmento), y la reacción requiere ATP (adenosina trifosfato). En esta memoria, por tanto “luciferasa” y “luciferina” no se refieren a moléculas específicas, sino términos genéricos para un sustrato y su enzima asociada.

En esta memoria se define como gen “*Flt4*”, “FMS-like tyrosine kinase 4”, “VEGFR3”, “VEGFR-3”, “Chy” y/o “AI323512” una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido *Flt4*, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *Flt4*.

La modificación genética del gen *Flt4* que se realiza en la invención conduce a la expresión de un mensajero bicistrónico, que se expresa utilizando las señales de regulación endógenas del gen *Flt4*. La traducción de este mensajero da lugar simultáneamente a la síntesis de dos proteínas: el receptor VEGFR-3 intacto y la proteína de fusión EGFP-luciferasa. Por tanto, después de la modificación genética, el reporter EGFP-luc se expresa recapitulando exactamente el mismo patrón de expresión endógeno del gen *Flt4*, con idéntico control tanto a nivel espacial como temporal.

El utilizar la fusión EGFP-luciferasa como molécula reporter, permite monitorizar la expresión de VEGFR3 mediante técnicas de imagen óptica tanto por fluorescencia emitida por la EGFP como por luminiscencia emitida por la luciferasa en presencia de su sustrato específico, la luciferina.

La emisión fotónica que es emitida cuando la luciferasa reacciona con la luciferina adecuada puede ser detectada por un aparato sensible a la luz que se denomina luminómetro, o por microscopios ópticos modificados, o permitiendo la observación de procesos biológicos, incluso *in vivo*, en el animal completo previamente anestesiado.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “mamífero no humano” se refiere a un animal mamífero no humano de cualquier fondo genético, preferentemente animales de laboratorio como roedores, más preferentemente ratas y ratones, o primates no humanos. Dicho animal no humano puede tener, prácticamente, cualquier fondo genético conocido, es decir, puede tratarse de un animal tipo salvaje (*wild-type* ó *wt*) o se puede combinar con otras alteraciones genéticas en el mismo ratón, por ejemplo, un animal transgénico, mutante o deficiente (*knock-out* ó *KO*), con mutaciones espontáneas o inducidas experimentalmente, así mismo en cualquier fondo genético.

El término “transgénico”, aplicado a mamífero no humano, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a mamíferos que contienen un transgén e incluye, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a animales transgénicos convencionales, u obtenidos por recombinación homologa: *KOs*, *KIs*, modelos condicionales etc.) en cualquier fondo genético.

Los autores de la presente invención han introducido el alelo modificado *knock-in* de *Flt4*, *Flt4*-IRES-EGF-PLuc, en un ratón inmunosuprimido (*nu/nu*). Este fondo genético aporta la ventaja de que permite hacer ensayos de xenografts con líneas tumorales de diferentes orígenes, tanto murinas como humanas y cuantificar la angiogénesis/linfoangiogénesis en relación al tamaño de los tumores mediante la combinación de diferentes técnicas de imagen *in vivo*. Así mismo, utilizando líneas metastásicas se podría cuantificar la angiogénesis asociada al establecimiento de metástasis en este modelo.

La ventaja añadida de utilizar un fondo nude (*nu/nu*) es que en ratones desnudos no se produce el enmascaramiento de la señal emitida por la luciferasa como consecuencia de la interferencia del pelo del animal, con lo cual la señal es más intensa y permite una mejor detección y cuantificación de cambios débiles de expresión. Por tanto, en una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano es un ratón inmunodeprimido (*nu/nu*).

La molécula reporter (la fusión EGFP-luciferasa) se expresa bajo el control de las señales de expresión endógenas del gen *Flt4* y por lo tanto tiene un patrón de expresión idéntico a la del receptor tanto en el espacio como en el tiempo. Esto no ocurre en los modelos transgénicos convencionales.

La inserción del *cassette reporter* se hace en la región 3' no traducida del gen (3'UTR, del inglés *untranslated region* o bien de *untranslated trailer*), fuera de la secuencia codificante, por lo que la secuencia codificante del gen *Flt4* no se encuentra alterada. En los modelos en los que la secuencia codificante del gen se sustituye por un marcador, el marcador sí recapitula el patrón de expresión endógeno del gen correspondiente pero simultáneamente en estos modelos se inactiva una copia del gen lo cual en muchos casos puede dar lugar a un fenotipo asociado que puede manifestarse incluso en heterocigosis estando la segunda copia del gen intacta (*haploinsuficiencia*).

En esta memoria, un “*cassette*” o “casete” es una región codificante de un gen procedente de un organismo procarionta o eucariota flanqueada por los elementos reguladores necesarios para su expresión *in vivo* o *in vitro*. Aunque los casetes de expresión pueden tener configuraciones muy variadas, deben contener por lo menos un promotor (*promoter*), una región codificante (ADNc eucariota o gen procarionta) y un terminador de la transcripción (*terminator*) o un sitio de poliadenilación, según se trate de un gen derivado de un organismo procarionta o de un ADNc procedente de un organismo eucariota. A esta configuración básica se le añade, si fuera necesario, una secuencia con función reguladora para la expresión natural del gen en el sistema elegido, p.ej.: un operador, un potenciador, la secuencia de Shine y Dalgarno para la unión al ARNr de *E. coli*, o las secuencias de un péptido señal (si la proteína se exporta).

En otro aspecto de la invención, el mamífero de la invención tiene introducida la construcción IRES-EGFP-Luciferasa 149 nucleótidos abajo del codón de parada TGA dentro de la región 3'UTR del gen *Flt4*.

El gen reporter, al introducirse en la región 3'UTR del gen *Flt4*, entre el codón de parada y la secuencia de poliadenilación, no afecta a la expresión normal de este gen, por lo que el modelo animal puede ser utilizado tanto en heterocigosis como en homocigosis. Esto aporta la ventaja de poder controlar la señal basal de fluorescencia/luminiscencia según los requisitos del ensayo, sin que esto tenga ninguna consecuencia en el fenotipo del modelo a estudiar.

Los seres humanos y los ratones de laboratorio (ambos mamíferos euterios) tienen más genes en común que los que se podrían encontrar entre los humanos y animales no-euterios. El parecido genético entre las dos especies permite comparar los genes casi directamente, y permite a los científicos encontrar los mismos genes en humanos para decodificar las rutas y mecanismos de las enfermedades humanas, porque los ratones también pueden desarrollarlas. Por tanto, en otra realización preferida, el mamífero de la invención es un ratón (*Mus musculus*).

Ventajosamente, la construcción génica IRES-EGFP-Luciferasa está incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia. Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación estable de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales.

Así, en otro aspecto de la invención se proporciona un vector de *gene-targeting*, de ahora en adelante vector de la invención, que comprende la construcción que contiene el cDNA que codifica para la proteína de fusión EGFP-luciferasa, precedida de una secuencia de entrada interna de ribosomas (IRES), las secuencias genómicas del locus

Flt4 que flanquean el punto de integración de la construcción IRES-EGFP-luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4, y un *cassette* de selección positiva que comprende un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK en la Fig. 1), un gen de resistencia a la neomicina (NEO en la Fig. 1) y una señal poliA del virus SV40, flanqueado por secuencias frt.

En una realización preferida, el vector de la invención se encuentra acompañado además por un *cassette* de selección negativa que comprende el promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa de ratón, la secuencia codificante del gen de la timidina quinasa del virus herpes simple (TK en la Fig. 1), y una señal poliA del virus SV40.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención del mamífero de la invención, en adelante método de la invención, que comprende:

- a) construir un vector de la invención según se ha descrito más arriba,
- b) transfectar dicha construcción en una población de células madre embrionarias, y seleccionar las células madre embrionarias que han integrado de forma estable el vector de la invención en su genoma por recombinación homologa.
- c) incorporar los clones de células madre embrionarias recombinadas del paso b) a embriones huésped, de manera que las células recombinadas contribuyan a todos los linajes celulares del embrión,
- d) permitir el desarrollo del embrión para obtener un mamífero no humano quimérico con el alelo que expresa la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.
- e) cruzar el mamífero no humano quimérico del paso d) para producir mamíferos heterocigóticos para la expresión de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4,
- f) cruzar los individuos heterocigóticos según el apartado e) con animales transgénicos que expresan la recombinasa FLP de forma ubicua en todas las células incluida la línea germinal (Tg-pCAG FLP) para eliminar el cassette pGK-neo flanqueado por los sitios Frt,
- g) cruzar los individuos heterocigóticos según el apartado f) entre sí para producir un mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la expresión de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.

En una realización preferida del método de la invención las células madre embrionarias son V6.4 de fondo genético híbrido F1(C57BL/6 x 129).

Tal como se utiliza en la presente invención el término "transfectar" se refiere a cualquier técnica o procedimiento que permita la integración en una serie de células de un organismo vivo de un gen exógeno, o "transgén", y que confiere a dichas células y al organismo que las porta una nueva propiedad biológica. Preferiblemente el método de transfección es la electroporación. Dicho transgén o gen exógeno se refiere a un ADN normalmente no residente, ni presente en la célula que se pretende transformar. En el caso particular de la presente invención el ADN codifica para la EGFP y para una luciferasa. Por otro lado, el proceso de transgénesis para obtener el animal modelo de la invención puede ser aplicado tanto a animales completamente desarrollados como a embriones del mismo siempre que permita la integración de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4. Preferiblemente, el proceso de transgénesis es aplicado a embriones.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante célula de la invención, aislada del mamífero de la invención o que ha integrado el vector de la invención por recombinación homologa. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la línea celular derivada de la o las células de la invención.

El mamífero de la invención es útil en el seguimiento no invasivo de la angiogénesis en tumores y en otras patologías y su aplicación al desarrollo de terapias antiangiogénicas. Además tiene una utilidad universal para el estudio de cualquier proceso asociado al funcionamiento y desarrollo del endotelio, como procesos inflamatorios, patologías vasculares y particularmente, crecimiento tumoral, extravasación de células tumorales y establecimiento de metástasis.

La utilización del modelo como reporter de linfangiogénesis/angiogénesis/inflamación implica también su utilización para el ensayo de fármacos dirigidos a modular estos procesos y por tanto para el desarrollo de terapias antiangiogénicas, antitumorales y antimetastásicas.

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención de procesos inflamatorios que comprende:

- a) inducir un proceso inflamatorio y/o angiogénico en el mamífero de la invención,

b) expresar de forma recombinante el agente, o administrar el agente al mamífero de la invención de a),

b) comparar el nivel de emisión de y/o luminiscencia en el mamífero de la invención de a) con:

i. el nivel de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia en el mismo mamífero de la invención antes de la administración del compuesto,

ii. el nivel de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia en otro mamífero de la invención, al que no se le ha administrado el compuesto; o

iii. un nivel estándar de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia para los mamíferos según i o ii;

donde un cambio favorable con el nivel del indicador (disminución de la fluorescencia y/o luminiscencia) en relación con el cambio de referencia usando animales normales no afligidos por procesos inflamatorios en condiciones comparables, indica que el compuesto es activo para tratar dicho proceso inflamatorio.

La inducción del proceso inflamatorio y/o angiogénico en el mamífero de la invención se puede realizar por diversos medios, entre los que se incluyen, pero sin limitarnos, infligir una herida, administrar un agente angiogénico, inducir un proceso tumoral, xenografts en un modelo nude (nu/nu).

En la presente invención, se entiende por “agente” cualquier 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.

En una realización preferida de este aspecto, el mamífero de la invención es un ratón. En una realización aún más preferida es un ratón nude (nu/nu). En una realización aún más preferida, la introducción del *cassette* IRES-EGFP-Luciferasa se realiza 149 nucleótidos abajo del codón de parada TGA dentro de la región 3'UTR del gen Flt4. Y en otra realización aún más preferida el mamífero de la invención es homocigótico para la introducción del *cassette* IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención de procesos tumorales que comprende:

a) inducir un proceso tumoral en el mamífero de la invención,

b) expresar de forma recombinante el agente, o administrar el agente al mamífero de la invención,

b) comparar el nivel de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia en el mamífero de la invención de a) con:

i. el nivel de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia en el mismo mamífero de la invención antes de la administración del compuesto,

ii. el nivel de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia en otro mamífero de la invención, al que no se le ha administrado el compuesto; o

iii. un nivel estándar de emisión de fluorescencia y/o luminiscencia para los mamíferos según i o ii;

donde un cambio favorable con el nivel del indicador (fluorescencia y/o luminiscencia) en relación con el cambio de referencia usando animales normales no afligidos por el tumor inducido en condiciones comparables, indica que el compuesto es activo para tratar dicha enfermedad.

En una realización preferida de este aspecto, el mamífero de la invención es un ratón. En una realización aún más preferida es un ratón nude (nu/nu). En una realización aún más preferida, la introducción del *cassette* IRES-EGFP-Luciferasa se realiza 149 nucleótidos abajo del codón de parada TGA dentro de la región 3'UTR del gen Flt4. Y en otra realización aún más preferida el mamífero de la invención es homocigótico para la introducción del *cassette* IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección y aislamiento de células endoteliales de los vasos linfáticos en distintos estadios del desarrollo de un mamífero no humano, que comprende:

a) disgregar los tejidos de dicho mamífero no humano,

b) detectar y aislar las células que expresan EGFP mediante citometría de flujo.

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

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Generación del modelo VEGFR3-IRESEGFPluc KI: estrategia de gene targeting.*

A) Esquema de la estructura del gen *Flt4*, el vector de gene *targeting* utilizado y el alelo obtenido por recombinación homóloga en células ES. Se muestra además la posición de los sitios de restricción *ScaI* utilizados en el análisis por Southern blot de los clones recombinantes así como la posición de los fragmentos de DNA empleados como sondas en dicho análisis. Finalmente se muestra la estructura del alelo recombinado una vez eliminado el casete de selección positiva (PGK-neo) mediante la actividad de la recombinasa *Flp*.

B) Análisis de clones recombinantes mediante Southern Blot. Se muestra el tamaño de las bandas correspondientes a los alelos WT (*Flt4*+) y recombinante (*Flt4*-neo-IRESEGFPluc)

C) La escisión del casete PGKneo por la recombinasa *Flp* fue analizado mediante PCR con los primers indicados en la figura A para diferenciar *Flt4*-neo-IRESEGFPluc (izquierda) y *Flt4*IRESEGFPluc (derecha).

Fig. 2. *Análisis de la expresión de VEGFR3 y EGFP en el modelo reporter.*

A) Análisis de la expresión de VEGFR3 en embriones de 13.5 días de desarrollo mediante Northern blot. Se analizaron 15 μ g de RNA total de los genotipos indicados utilizando una sonda de 500 bp específica para el RNA mensajero de VEGFR3. El tamaño del RNA mensajero es el indicado tanto para el genotipo silvestre como para el knockin. Los niveles de GAPDH se muestran como control de carga.

B) Análisis de la expresión de VEGFR3 en embriones de 13.5 días de desarrollo mediante Western Blot. Se analizaron 100 μ g de extracto de proteína para cada uno de los genotipos indicados en 10% de SDS-PAGE. En la figura se muestran los inmunoblots para VEGFR3 y EGFP. Se incluye como control de carga el inmunoblot de α -Tubulin. Se observa que los niveles de expresión de VEGFR3 permanecen constantes en los diferentes genotipos.

C) Análisis de la expresión de VEGFR3-EGFP en embriones KI/KI a diferentes estadios de desarrollo mediante microscopía confocal. Se observa una expresión específica de EGFP en los vasos linfáticos de los embriones mientras que no se detecta expresión en los vasos sanguíneos, que se reconocen por la autofluorescencia de los eritrocitos.

Fig. 3. *Monitorización de la expresión de VEGFR3 durante el desarrollo postnatal en el modelo reporter.*

La actividad de luciferasa *in vivo* en hembras VEGFR3-IRESEGFPluc (n=8) a las edades de 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 15 semanas se monitorizó en un IVIS Spectrum.

A) Imágenes representativas de la actividad de luciferasa monitorizadas en las zonas dorsal y ventral de cada animal.

B) Cuantificación de la actividad de luciferasa mostrada en las imágenes en A. La actividad de luciferasa está expresada en fotones por segundo por cm^2 para corregir por la diferencia de tamaño de los animales a diferentes edades. Los datos se muestran como media + SD.

Fig. 4. *Análisis de la expresión de VEGFR3 en el modelo reporter en ensayos de cicatrización cutánea.*

A) Imágenes representativas de la emisión de luciferasa durante un ensayo de cicatrización cutánea con o sin administración de dexametasona (DEX).

B) Cuantificación de la emisión de luciferasa (B.1) y de la cicatrización (B.2) durante el ensayo. Los datos se muestran como media + SD.

En los paneles A y B se muestra un máximo de emisión de luciferasa en el día 8 del ensayo alrededor de los extremos de la herida, que se correlaciona con una cicatrización del 30%. No se detecta expresión de luciferasa después del día 23 cuando la herida está completamente cicatrizada. El tratamiento con dexametasona induce una disminución significativa de la emisión de luciferasa en los días 8-10 de cicatrización, sin embargo la señal es la misma en los animales tratados a partir del día 15, cuando la herida está cicatrizada aproximadamente un 40%. El tratamiento con dexametasona causa una disminución en el reclutamiento de macrófagos a la zona de cicatrización alterando la cinética del proceso. Teniendo esto en cuenta, y que los macrófagos expresan VEGFR3, el pico de emisión

que se observa alrededor del día 10 en animales no tratados puede reflejar el proceso de reclutamiento de macrófagos a la zona de la herida. La disminución en el reclutamiento de macrófagos puede explicar asimismo el retraso en el proceso de cicatrización como se muestra en la Fig. B2.

Fig. 5. *Expresión de VEGFR3 asociada a la inflamación inducida mediante el ensayo de hipersensibilidad por contacto (CHS).*

Ratones VEGFR3-IRES-EGFPluc KI/KI (n=5) se pre-sensibilizaron mediante tratamiento tópico con oxazolona en el abdomen. Seis días después la inflamación se indujo en la oreja izquierda de los animales mediante administración tópica de 1% de oxazolone. Otro grupo de animales a los que se indujo CHS (n=7) se trató además con dexametasona, administrada intraperitonealmente a una dosis diaria de 5 mg/Kg de peso.

A) Emisión de luciferasa medida diariamente *in vivo* durante el tratamiento

B) Cuantificación de la emisión que se muestra en A. Los datos se muestran como media + SD. (OXA) Oxazolona; (DEX) Dexametasona.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de en la monitorización de los procesos de linfangiogenesis/angiogenesis/inflamación.

Estrategia para la construcción del modelo Knockin (Fig. 1)

Se ha introducido en la región 3' no traducida (UTR) del gen que codifica para el receptor VEGFR3 (flt4), cuya expresión es específica de células endoteliales, la secuencia codificante de la proteína de fusión EGFPluc precedida por una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). La fusión IRES-EGFPluc se introduce entre el codón de terminación del gen flt4 y la secuencia de poliadenilación. Esta estrategia permite generar un mensajero bicistónico que da lugar a la expresión simultánea de dos genes con la misma regulación transcripcional y por tanto, en este caso, dirigir la expresión de la fusión EGFPluc específicamente a las células endoteliales en las que se transcriba el gen flt4 sin alterar la expresión endógena del mismo.

Para la obtención del alelo knockin Flt4-IRES-EGFPluc se diseñó en primer lugar un vector de *targeting* "universal" que permite aplicar esta misma estrategia a cualquier gen del genoma murino. La estructura de éste vector es la que se representa en la figura 1A y está preparado para clonar en los sitios únicos NotI y SalI los brazos de homología del gen de interés.

NotI y SalI son sitios únicos en el vector que reconocen estas enzimas de restricción y donde se pueden insertar los brazos de homología de cualquier gen. PGK-neo y PGK-hsvTK son los marcadores de selección positiva y negativa respectivamente.

Este vector contiene un marcador que expresa un gen de resistencia a neomicina bacteriano bajo el control del promotor del gen que codifica la fosfoglicerato quinasa de ratón (PGK-neo). El casete PGK-neo permite la selección de los clones en los que el vector se ha integrado, bien al azar o bien por recombinación homóloga. Este marcador está flanqueado por sitios *frt* para su posterior eliminación mediada por la recombinasa FLP. El vector incluye un marcador para selección negativa que se pierde si el vector se integra por recombinación homóloga pero no si se integra al azar. Este último es el casete que expresa el gen de la timidina quinasa del virus herpes (hsvTK) también bajo el control del promotor PGK. La pérdida de este casete se selecciona en presencia de ganciclovir. Estos dos elementos permiten seleccionar las células que hayan incorporado el vector mediante recombinación homóloga. La inclusión del marcador de selección negativa proporciona un aumento de 5-10 veces en la frecuencia de clones recombinantes homólogos.

El vector además contiene sitios de restricción únicos para las enzimas SalI y NotI que son poco frecuentes en el genoma del ratón, y que pueden ser utilizados para clonar los brazos de homología 5' y 3' respectivamente.

El gen reportero que se ha utilizado es una proteína de fusión EGFP-luciferasa. La EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) es una variante de la proteína GFP, más brillante y con mejores niveles de expresión en células de mamífero. La fusión entre la proteína verde fluorescente y la luciferasa tiene como ventaja que permite la monitorización de su expresión tanto por captación de fluorescencia como de bioluminiscencia.

Finalmente, los brazos de homología utilizados para la construcción se han obtenido a partir de DNA genómico de C57BL/6, y se han amplificado por PCR a partir de un BAC (RP23-445K3) que contiene este gen. El tamaño de cada uno de los brazos es de 3.3 Kb y 3.7 Kb el 3' y 5' respectivamente. Los primeros utilizados para la amplificación del brazo de homología 5' son:

ES 2 338 971 B1

Flt45F SEQ ID NO: 3

Flt45R SEQ ID NO: 4

y para el brazo 3' son:

Flt43F SEQ ID NO: 5

Flt43R SEQ ID NO: 6.

La amplificación se hizo utilizando la TAQ polimerasa TAQ LA de Takara mediante 2 ciclos de pre-PCR (98°C 10 s, 54°C 1 m, 68°C 5 m) y 30 ciclos de PCR (98°C 10 s y 68°C 5 m).

Una vez construido el vector, éste se amplificó y después de linearizarlo mediante digestión con NotI se electroporó en células madre embrionarias (ES) V6.4 de fondo genético híbrido F1 [C57BL/6 129SvJ], típicamente 17 millones de células se electroporan con 20 microgramos de DNA linearizado en 0,8 ml de PBS, a 250 voltios y 500 microFaradios, en una cubeta de 0,4 cm de ancho. La evaluación de la frecuencia de recombinación homologa y la selección de clones recombinantes homólogos se realizó mediante análisis por Southern Blot. Para ello se extrajo DNA genómico de 60 clones. Para comprobar la recombinación homologa en el brazo 5', el DNA se digirió con Scal y se analizó por Southern blot utilizando como sonda un fragmento de 262 pb que hibrida en una zona externa al brazo de homología 5'. La recombinación en el brazo 3' se analizó de forma semejante, digiriendo el DNA genómico con Scal y utilizando como sonda para Southern Blot un fragmento de 324 pb. De los 60 clones analizados, 18 de fueron positivos para ambos brazos de homología.

Finalmente dos de los clones recombinantes (ESIM4.31 y ESIM4.52) se incorporaron a embriones en desarrollo mediante la técnica de agregación. Para ello, se extrajeron mórulas de ratones de la cepa CD1, a día 2,5 de gestación. Estos embriones, una vez eliminada la zona pelúcida mediante digestión con solución de Tyrode, se agregaron con cúmulos de unas 6-8 células por embrión. Los embriones agregados (aproximadamente 70) se incubaron toda la noche en medio KSOM a 37°C, 5% CO₂ y al día siguiente se transfirieron al oviducto de hembras pseudogestantes de la cepa CD1 a día 0,5 de pseudogestación. El parto tuvo lugar a los 19 días después de la transferencia de los embriones. Entre las crías nacidas las quimeras se distinguieron por la presencia de pigmentación en la piel y en el pelo, que indica la contribución de las células ES, ya que el embrión huésped proviene de una cepa albina. Se obtuvieron 10 quimeras (ESIM4.31, 5 machos (1)100%, 1(70%), 2(50%), 1(30%) y para el clon ESIM4.52, 5 machos 100%).

Las mejores quimeras machos, se cruzaron con hembras CD1 para analizar la contribución de las células ES a la línea germinal (aparición de crías pigmentadas). 7 quimeras (de 7 testadas) transmitieron la pigmentación a su descendencia. De 71 crías analizadas por PCR, 20 contenían el alelo recombinante. Estos animales, heterocigotos para el alelo Flt4-IRES-EGFP-luciferasa, se cruzaron entre sí para generar animales homocigotos. La frecuencia de animales homocigotos nacidos de estos cruces fue del 25%, indicando que la mutación en homocigosis no resulta en letalidad embrionaria o perinatal.

Análisis de expresión mediante Northern y Western blot (Fig. 2)

Para los ensayos de Northern, se extrajo RNA total a partir de embriones a día de desarrollo E13,5 de los genotipos indicados, mediante extracción con Trizol. Se analizaron 15 microgramos de RNA total de cada genotipo. Como sonda se utilizó un fragmento de 500 pb correspondiente a la zona 3'UTR del gen flt4 externo al sitio de integración del reporter IRES-EGFP-luciferasa. La sonda para GAPDH corresponde a un fragmento de 400 pb de la secuencia codificante del gen de la GAPDH de rata.

Para analizar los niveles de proteína por Western blot, 100 microgramos de extracto de proteína total obtenido a partir de embriones a día E13,5 de cada genotipo, se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con anticuerpos anti-VEGFR3 (AFL4 de Becton Dickinson) y anti-EGFP (AB3080 Chemicon International) a las diluciones 1:60 y 1:400 respectivamente.

Monitorización de la expresión de EGFP en embriones (Fig. 2)

Embriones en diferentes días de gestación se extrajeron de útero en PBS y se observaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP5(AOBS) equipado con el software de adquisición LAS AF. Para excitar la EGFP se utilizó un láser de argón de 488 nm.

Determinación de la actividad de luciferasa en extractos

La actividad de luciferasa en extractos de diferentes órganos y tejidos se midió utilizando un kit comercial de Promega (E-1501) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Determinación de la expresión de luciferasa in vivo. (Fig. 3, 4 y 5)

Animales a diferentes edades y de diferentes genotipos son anestesiados por inhalación de isofluorano. A continuación se les administra D-luciferina (Xenogen XR-1001) a una concentración de 15 mg/ml en PBS mediante una
5 única inyección intraperitoneal. La dosis de luciferina es de 150 mg/Kg de peso. Los animales inyectados se observan en un IVIS Spectrum (Xenogen Corp.) adquiriendo imágenes durante 30 segundos de forma continuada hasta que se alcanza el máximo de emisión (aproximadamente a los 20 minutos de la administración de la luciferina).

Ensayos de cicatrización cutánea. (Fig. 4)

10 En este ensayo se emplean hembras de 11-14 semanas de edad y heterocigotas para el alelo VEGFR3-EGFPluciferasa KI. Los animales son anestesiados por inhalación de isofluorano. Se les afeita la zona dorsal y se realiza una herida circular en la piel, aproximadamente a una altura media de la zona dorsal, con un punzón de biopsia de 8 mm de diámetro, escindiendo la piel y el pániculo carnosos. A diferentes días se mide la emisión de luciferasa en un IVIS
15 Spectrum como se describe anteriormente. En este caso el ROI (*región of interest*), donde se mide la señal, corresponde al área inicial de la herida para cada ratón en cada punto. En paralelo se mide el diámetro de la herida, en orientación vertical (V) y horizontal (H) con un calibre. Para calcular el área en cada punto se multiplican las medias V x H. La cicatrización se representa en cada punto como el tamaño porcentual de la herida respecto al tamaño de la herida a día 0.

20 Para estudiar la contribución de la inflamación al proceso de cicatrización, en el mismo ensayo algunos animales fueron tratados con dexametasona (Sigma D1756) a una concentración de 1 mg/ml en Etanol y a una dosis de 5 mg/Kg de peso administrada mediante inyección intraperitoneal diaria. Los animales control fueron tratados de la misma forma sólo con vehículo.

Ensayo de hipersensibilidad por contacto (Fig. 5)

25 Hembras homocigotas para el alelo VEGFR3-EGFPluciferasa KI de aproximadamente 11 semanas de edad fueron pre-sensibilizadas por administración tópica de 50 microlitros de oxazolona al 2% en acetona/aceite. 4:1 v/v en el abdomen afeitado previamente. Seis días después (día 0) se indujo la inflamación por administración tópica de 10 microlitros de oxazolona al 1% en el mismo vehículo en la oreja izquierda del animal. La oreja derecha fue tratada sólo con vehículo como control interno. En paralelo, otro grupo de animales de la misma edad y genotipo fueron
30 tratados con dexametasona como se describe anteriormente. La emisión de luciferasa se midió diariamente a día 0 y durante los seis días siguientes al comienzo del tratamiento utilizando el IVIS Spectrum como se describe en los apartados anteriores. En este caso el ROI es sólo la oreja tratada o la oreja control de cada animal.

REIVINDICACIONES

1. Mamífero no humano genéticamente modificado cuyas células expresan la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4 con el mismo patrón de la expresión del receptor VEGFR-3, tanto en el espacio como en el tiempo.

2. Mamífero no humano genéticamente modificado de acuerdo con la reivindicación anterior, donde la expresión de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa se consigue mediante la introducción de la SEQ ID NO: 1 en el animal o uno de sus ancestros.

3. Mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el mamífero está inmunodeprimido.

4. Mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la introducción del cassette IRES-EGFP-Luciferasa se realiza 149 nucleótidos abajo del codón de parada TGA dentro de la región 3'UTR del gen Flt4.

5. Mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es homocigótico para la introducción del *cassette* IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.

6. Mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el mamífero es un ratón.

7. Vector de *gene-targeting* que comprende la construcción genética con el cDNA que codifica para la proteína de fusión EGFP-luciferasa, precedida de una secuencia de entrada interna de ribosomas (IRES), las secuencias genómicas del locus Flt4 que flanquean el punto de integración de la construcción IRES-EGFP-luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4, y un *cassette* de selección positiva.

8. Vector de *gene-targeting* según la reivindicación anterior donde el *cassette* de selección positiva comprende el promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa de ratón, un gen de resistencia a la neomicina y una señal poliA del virus SV40, flanqueado por secuencias frt.

9. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, acompañado además por un *cassette* de selección negativa que comprende, el promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa de ratón, la secuencia codificante del gen de la timidina quinasa del virus herpes simple, y una señal poliA del virus SV40.

10. Método de modificación genética para construir un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:

- a. construir un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
- b. transfectar dicha construcción en una población de células madre embrionarias no humanas, y seleccionar las células madre embrionarias que han integrado de forma estable el vector de (a) en su genoma por recombinación homóloga.
- c. incorporar los clones de células madre embrionarias recombinadas del paso (b) a embriones huésped no humanos de manera que las células recombinadas contribuyan a todos los linajes celulares del embrión.
- d. permitir el desarrollo de éstos embriones para obtener un mamífero no humano quimérico con el alelo que expresa la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.
- e. cruzar el mamífero no humano quimérico del paso (d) para producir mamíferos no humanos heterocigóticos para la modificación introducida, y opcionalmente,
- f. cruzar los individuos heterocigóticos según (e) entre sí para producir un mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la expresión de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3'UTR del gen Flt4.

11. Método según la reivindicación 10, donde las células madre embrionarias son V6.4 de fondo genético híbrido F1(C57BL/6 x 129).

12. Célula aislada de un mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o que ha integrado por recombinación homóloga un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7-9.

13. Línea celular derivada de una célula aislada según la reivindicación 12.

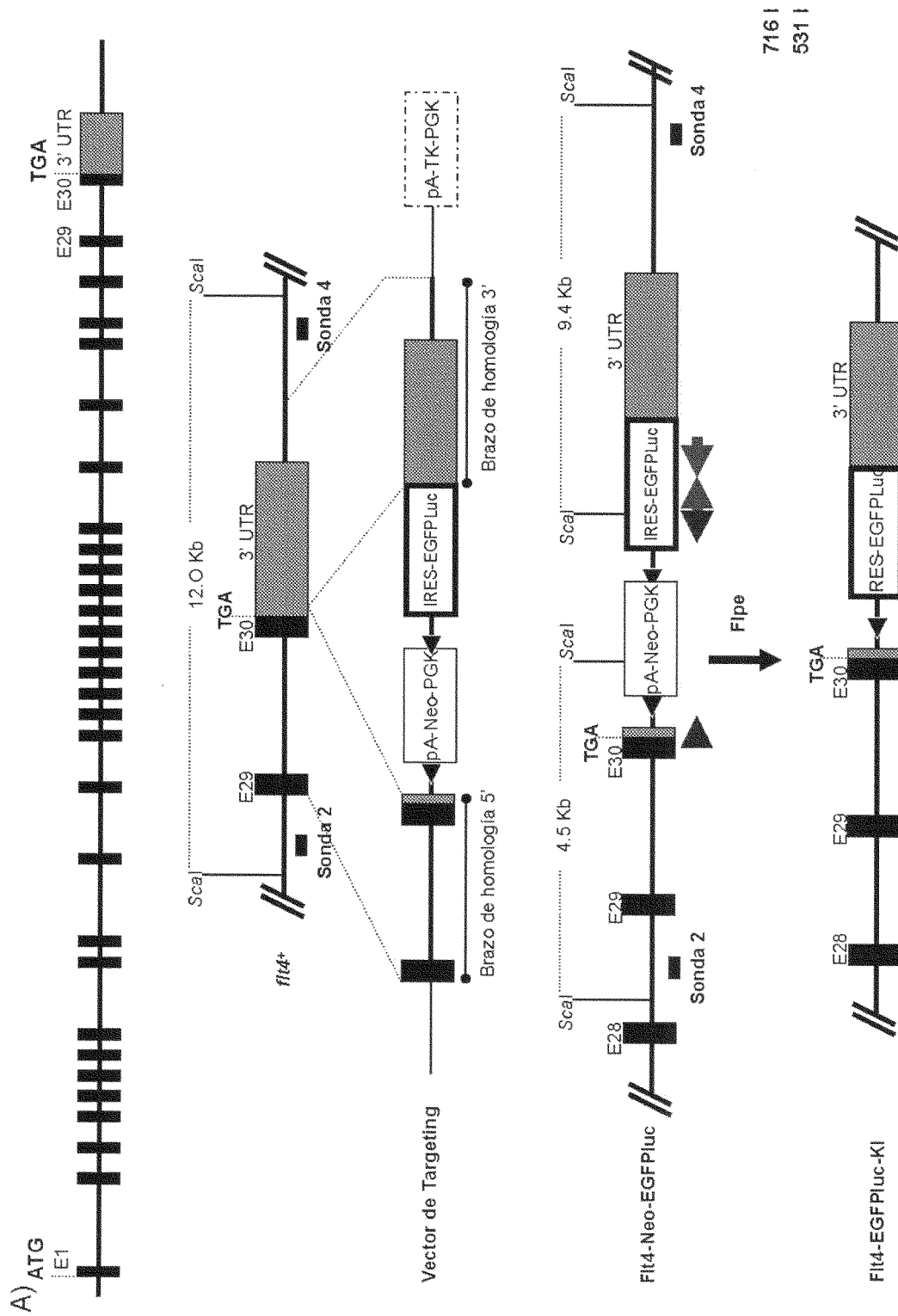


FIG. 1A

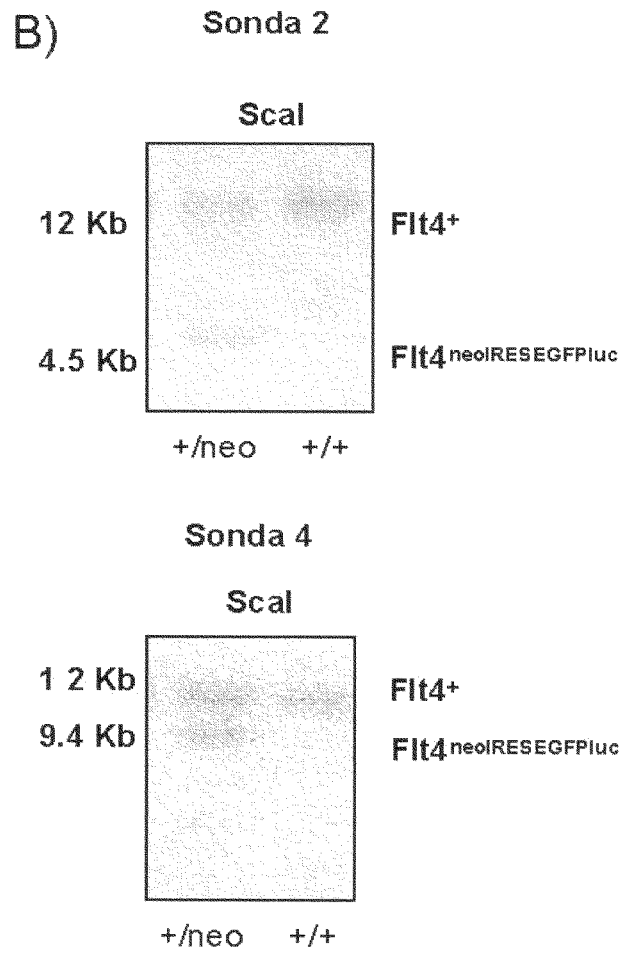


FIG. 1B

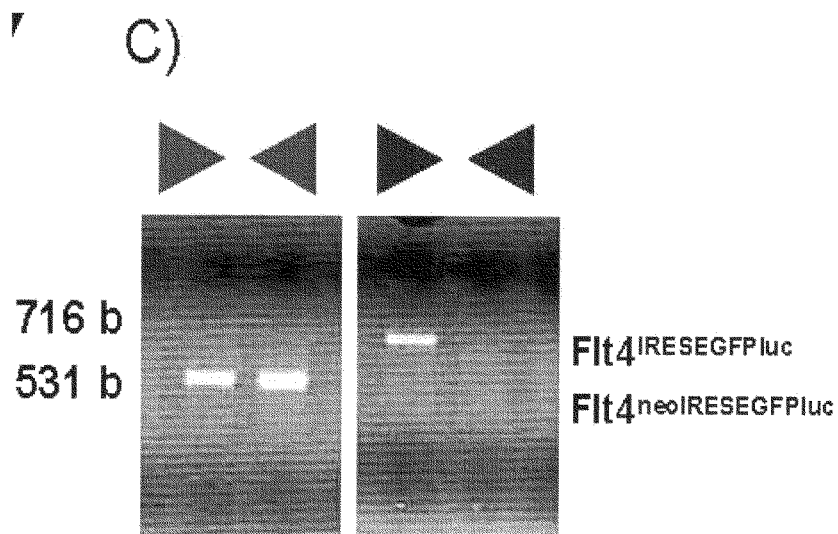
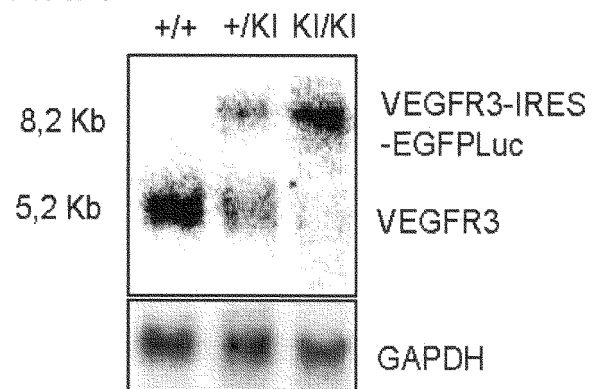


FIG. 1C

A) mRNA



B) Proteína

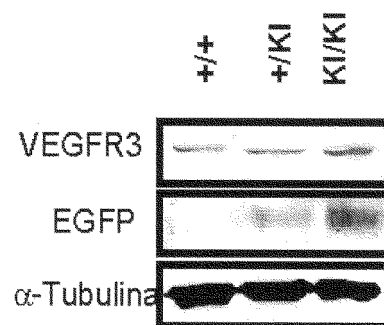


FIG. 2A y 2B

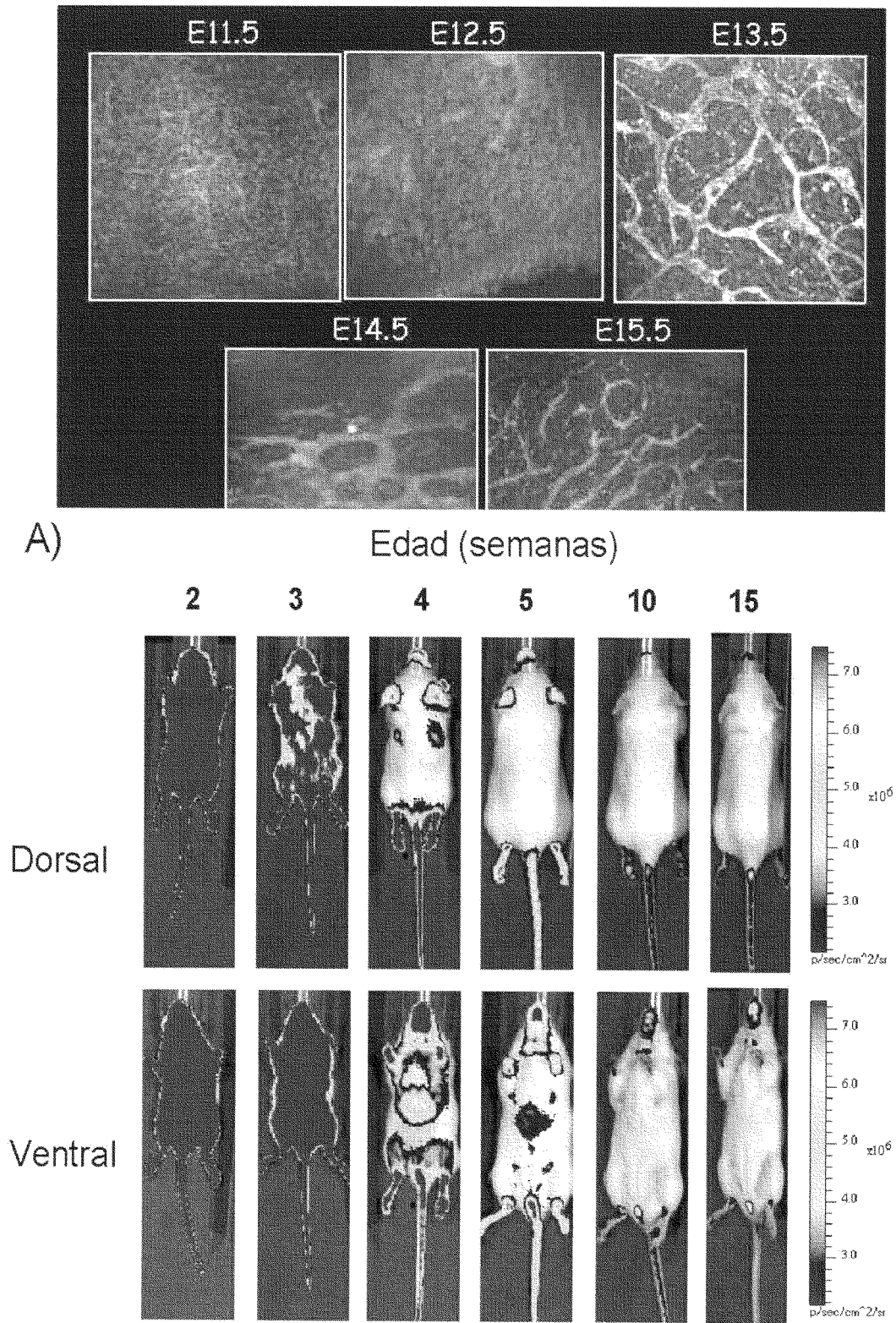


FIG. 3A

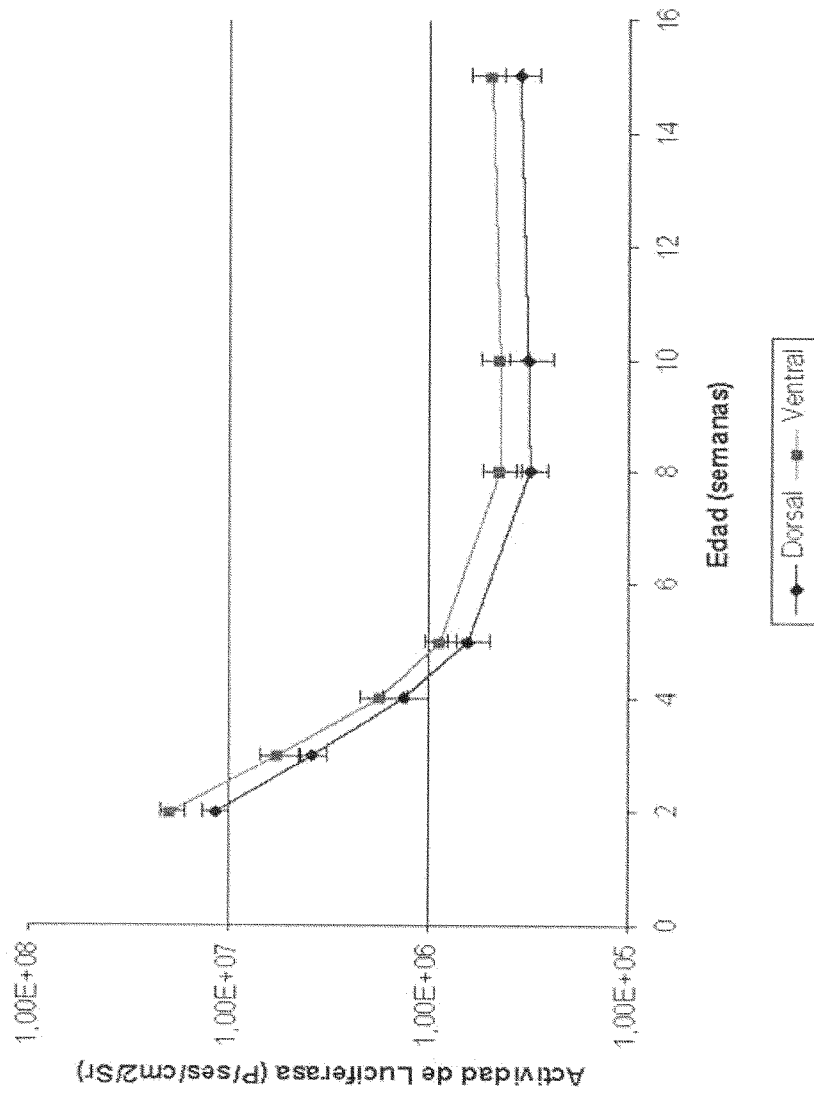


FIG. 3B

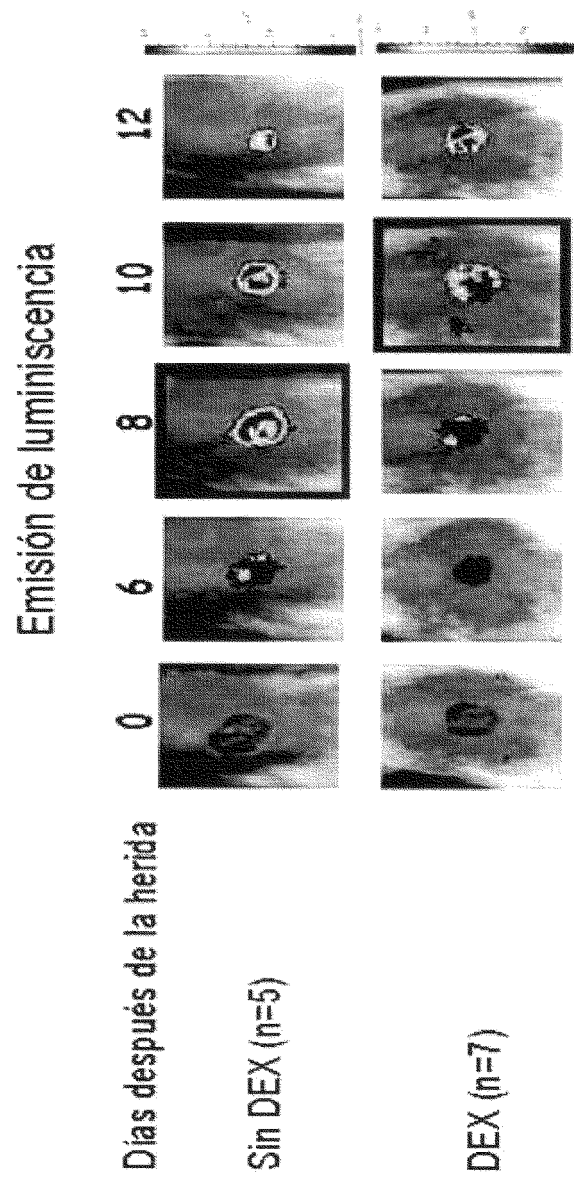
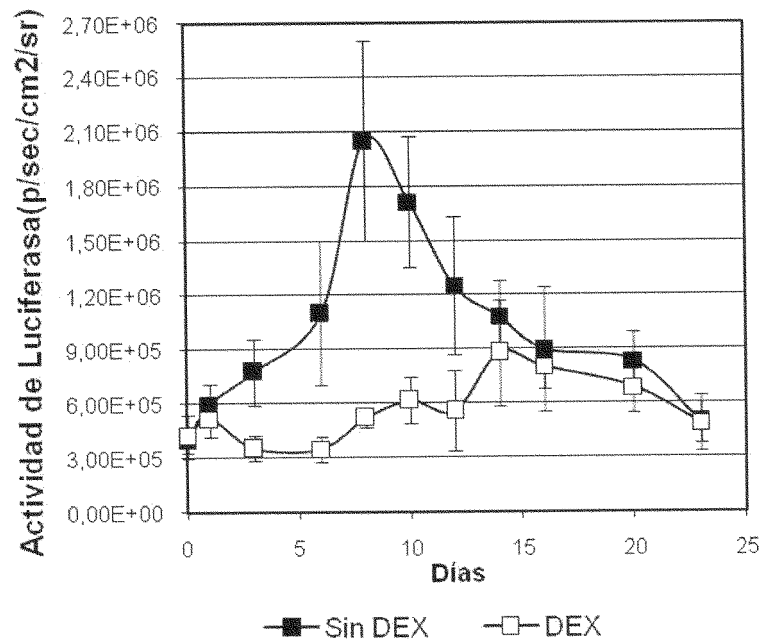


FIG. 4A

B1)

Expresión de VEGFR-3



B2)

Cicatrización

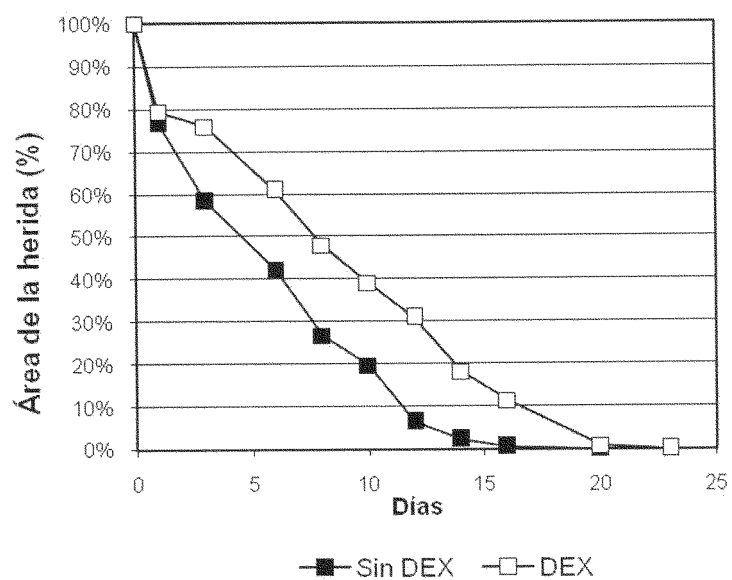


FIG. 4B

Inflamación inducida por Oxazolona
Emisión de Luminiscencia en respuesta al tratamiento con Oxazolona

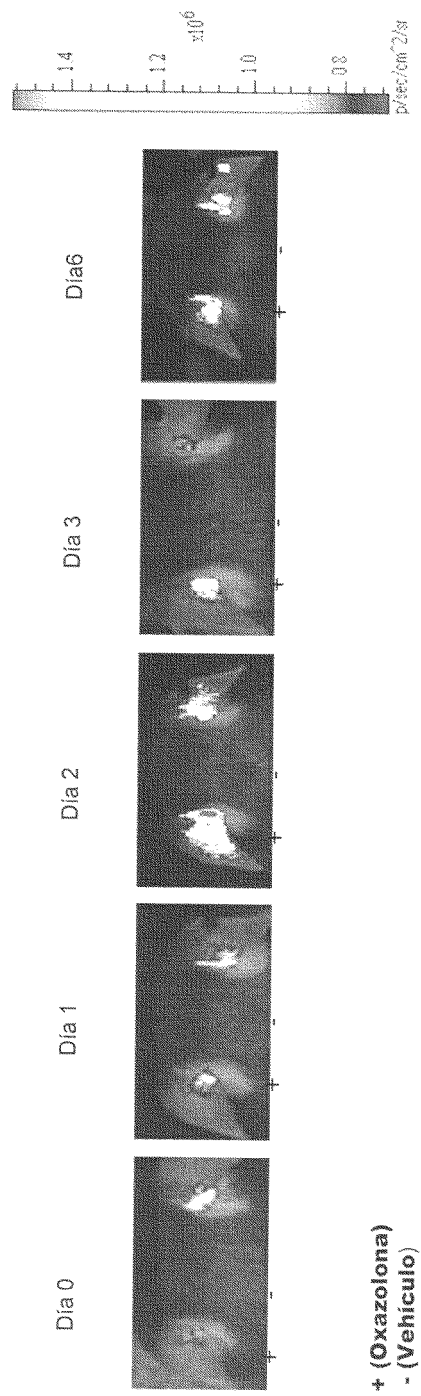


FIG. 5A

**Cuantificación de la emisión de luminiscencia.
Efecto de la administración de Dexametasona**

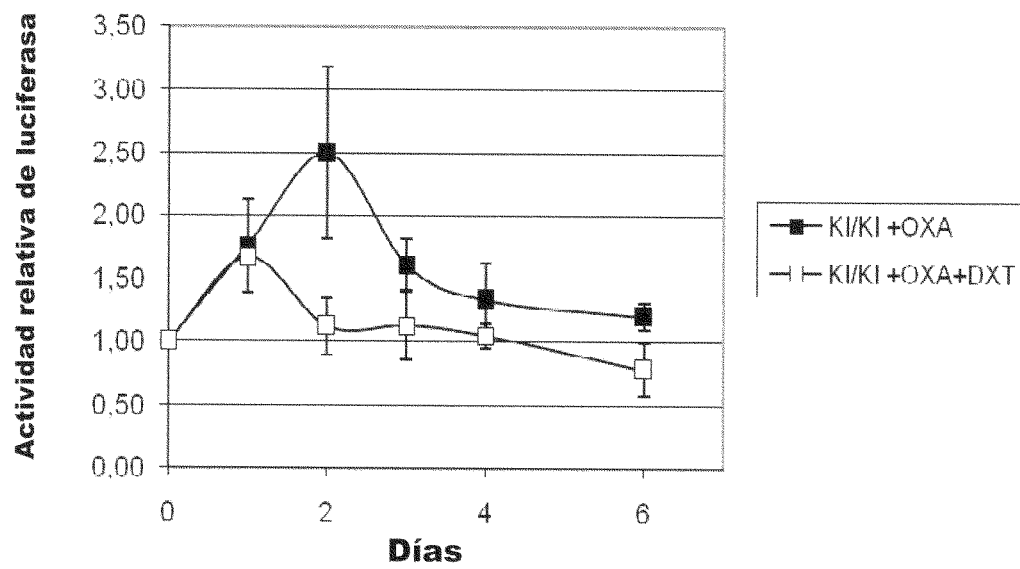


FIG. 5B

ES 2 338 971 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación Centro Nacional de investigaciones Oncológicas

5 <120> Modelo animal para el estudio de la angiogénesis y linfoangiogénesis *in vivo*.

<130> 1599.6

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 2915

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> construcción (fusión) IRES-EGFPluc

25 <400> 1

	aattccggtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg	60
	gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag	120
30	gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt	180
	ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc cccacactgg cgacaggtgc ctctgcggcc	240
35	aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga	300
	gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga	360
	aggatgcccc gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct	420
40	ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt	480
	tttcctttga aaaacacgat gataatacca tggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg	540
	gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt	600
45	ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca	660
	ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt	720
50	gcttcagccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg	780
	aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagacccgcg	840
	ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact	900
55	tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg	960
	tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca	1020
	acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg	1080
60	acggcccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag	1140
	accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca	1200
	ctctcgcat ggacgagctg tacaagtccg gccggactca gatctcgagc tcaagcttcg	1260
65	aattcgaaga cgccaaaaac ataaagaaag gcccggcgcc attctatccg ctggaagatg	1320

ES 2 338 971 B1

```

gaaccgctgg agagcaactg cataaggcta tgaagagata cgccctgggt cctggaacaa 1380
ttgctttttac agatgcacat atcgagggtg acatcactta cgctgagtac ttcgaaatgt 1440
5 ccgttcgggtt ggcagaagct atgaaacgat atgggctgaa tacaatcac agaatcgtcg 1500
tatgcagtga aaactctctt caattcttta tgccggtggt gggcgcggtta tttatcggag 1560
10 ttgcagttgc gcccgcgaac gacatttata atgaacgtga attgctcaac agtatgggca 1620
tttcgcagcc taccgtggtg ttcgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt ttgaacgtgc 1680
aaaaaaagct cccaatcatc caaaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg gattaccagg 1740
15 gatttcagtc gatgtacacg ttcgtcacat ctcatctacc tcccggtttt aatgaatacg 1800
attttgtgcc agagtccttc gatagggaca agacaattgc actgatcatg aactcctctg 1860
gatctactgg tctgcctaaa ggtgtcgtc tgccatag aactgcctgc gtgagattct 1920
20 cgcattgccag agatcctatt tttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg attttaagt 1980
ttgttccatt ccatcacggt tttggaatgt ttactacact cggatatttg atatgtggat 2040
25 ttcgagtcgt cttaatgtat agatttgaag aagagctggt tctgaggagc cttcaggatt 2100
acaagattca aagtgcgctg ctggtgccaa ccctattctc cttcttcgcc aaaagcactc 2160
tgattgacaa atacgattta tctaatttac acgaaattgc ttctggtggc gctcccctct 2220
30 ctaaggaagt cggggaagcg gttgccaaga ggttccatct gccaggatc aggcaaggat 2280
atgggctcac tgagactaca tcagctattc tgattacacc cgagggggat gataaaccgg 2340
gcgcggtcgg taaagttggt ccattttttg aagcgaaggt tgtggatctg gataccggga 2400
35 aaacgctggg cgttaatcaa agaggcgaac tgtgtgtgag aggtcctatg attatgtccg 2460
gttatgtaaa caatccggaa gcgaccaacg ctttgattga caaggatgga tggctacatt 2520
40 ctggagacat agcttactgg gacgaagacg aacacttctt catcgttgac cgcctgaagt 2580
ctctgattaa gtacaaaggc tatcagggtg ctcccgtga attggaatcc atcttgctcc 2640
aacaccccaa catcttcgac gcagggtgtc caggctcttc cgacgatgac gccggtgaac 2700
45 ttcccgccgc cgttgttgtt ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa gagatcgtgg 2760
attacgtcgc cagtcaagta acaaccgca aaaagttgcg cggaggagtt gtgtttgtgg 2820
50 acgaagtacc gaaaggtctt accggaaaac tcgacgcaag aaaaatcaga gagatcctca 2880
taaaggccaa gaagggcgga aagatcgccg tgtaa 2915

```

```

55 <210> 2
    <211> 1363
    <212> PRT
    <213> Mus musculus
60 <400> 2

```

```

65 Met Gln Pro Gly Ala Ala Leu Asn Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
    1          5          10          15

```

ES 2 338 971 B1

Leu Leu Gln Gly Leu Ala Asn Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
 20 25 30
 5 Asn Ile Thr Glu Asp Ser Tyr Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
 35 40 45
 10 Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Thr Trp Pro Gly Ala
 50 55 60
 15 Gln Glu Val Leu Thr Thr Gly Gly Lys Asp Ser Glu Asp Thr Arg Val
 65 70 75 80
 Val His Asp Cys Glu Gly Thr Glu Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
 85 90 95
 20 Leu Leu Ala Gln Thr His Ala Asn Asn Thr Gly Ser Tyr His Cys Tyr
 100 105 110
 25 Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Thr
 115 120 125
 30 Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Lys His Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
 130 135 140
 35 Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ser Met Trp Val Pro Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Gly Leu Asn Ile Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Ala Leu
 165 170 175
 40 His Pro Asp Gly Gln Glu Val Leu Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Arg
 180 185 190
 45 Val Pro Thr Gln Leu Leu Arg Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
 195 200 205
 50 Thr Trp Gly Asp Gln Asn Phe Leu Ser Asn Leu Phe Val Val His Ile
 210 215 220
 Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Tyr Pro Lys Lys Ser Met
 225 230 235 240
 55 Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
 245 250 255
 60 Glu Phe Asp Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
 260 265 270
 65 Ala Glu Arg Ala Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His

ES 2 338 971 B1

	275		280		285											
5	Thr	Glu 290	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu 295	Thr	Ile	His	Asn	Val 300	Ser	Gln	Asn	Asp
10	Leu 305	Gly	Pro	Tyr	Val	Cys 310	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly 315	Ile	Gln	Arg	Phe	Arg 320
15	Glu	Ser	Thr	Glu	Val 325	Ile	Val	His	Glu	Lys 330	Pro	Phe	Ile	Ser	Val 335	Glu
20	Trp	Leu	Lys	Gly 340	Pro	Val	Leu	Glu	Ala 345	Thr	Ala	Gly	Asp	Glu 350	Leu	Val
25	Lys	Leu	Pro 355	Val	Lys	Leu	Ala	Ala 360	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu 365	Phe	Gln	Trp
30	Tyr	Lys 370	Asp	Arg	Lys	Ala	Val 375	Thr	Gly	Arg	His	Asn 380	Pro	His	Ala	Leu
35	Val 385	Leu	Lys	Glu	Val	Thr 390	Glu	Ala	Ser	Ala	Gly 395	Val	Tyr	Thr	Leu	Ala 400
40	Leu	Trp	Asn	Ser	Ala 405	Ala	Gly	Leu	Arg	Gln 410	Asn	Ile	Ser	Leu	Glu 415	Leu
45	Val	Val	Asn	Val 420	Pro	Pro	His	Ile	His 425	Glu	Lys	Glu	Ala	Ser 430	Ser	Pro
50	Ser	Ile	Tyr 435	Ser	Arg	His	Ser	Arg 440	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys 445	Thr	Ala	Tyr
55	Gly	Val 450	Pro	Gln	Pro	Leu	Ser 455	Val	Gln	Trp	His	Trp 460	Arg	Pro	Trp	Thr
60	Pro	Cys	Lys	Thr	Phe	Ala 470	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg 475	Arg	Arg	Gln	Gln	Arg 480
65	Asp	Gly	Met	Pro	Gln 485	Cys	Arg	Asp	Trp	Lys 490	Glu	Val	Thr	Thr	Gln 495	Asp
	Ala	Val	Asn	Pro 500	Ile	Glu	Ser	Leu	Asp 505	Ser	Trp	Thr	Glu	Phe	Val	Glu
	Gly	Lys	Asn 515	Lys	Thr	Val	Ser	Lys 520	Leu	Val	Ile	Gln	Asp 525	Ala	Asn	Val
	Ser	Ala	Met	Tyr	Lys	Cys	Val 535	Val	Val	Asn	Lys	Val 540	Gly	Gln	Asp	Glu

ES 2 338 971 B1

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Ser Ile
 545 550 555 560
 5
 Glu Ser Glu Pro Ser Glu Asp Pro Leu Glu Gly Gln Ser Val Arg Leu
 565 570 575
 10
 Ser Cys Arg Ala Asp Asn Tyr Thr Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590
 15
 Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala Gln Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605
 20
 Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Glu Ala Asn Leu
 610 615 620
 25
 Glu Glu Ala Glu Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Asn Ile
 625 630 635 640
 30
 Pro Arg Val Ala Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655
 35
 Asp Arg Arg Ser Gln Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670
 40
 Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
 675 680 685
 45
 Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Arg Cys Pro Val Ala Gly Ala
 690 695 700
 50
 His Val Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Lys
 705 710 715 720
 55
 Glu Ser Gly Ile Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Arg Leu Ser Ile Gln
 725 730 735
 60
 Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
 740 745 750
 65
 Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
 755 760 765
 70
 Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Val
 770 775 780
 75
 Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
 785 790 795 800
 80
 Lys Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile

ES 2 338 971 B1

	805	810	815
5	Met Asp Pro Gly 820	Glu Val Pro Leu Glu 825	Glu Gln Cys Glu Tyr 830
10	Tyr Asp Ala 835	Ser Gln Trp Glu Phe 840	Pro Arg Glu Arg Leu 845
15	Arg Val 850	Leu Gly His Gly Ala 855	Phe Gly Lys Val Val 860
20	Phe 865	Gly Ile Asn Lys Gly 870	Ser Ser Cys Asp Thr 875
25	Val Ala Val Lys Met 880	Leu Lys Glu Gly Ala 885	Thr Ala Ser Glu His 890
30	Arg Ala Leu Met Ser Glu 895	Leu Lys Ile Leu 900	Ile His Ile Gly Asn 905
35	His Leu Asn Val Val 910	Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro 920	Asn Gly Pro Leu Met Val 925
40	Ile Val Glu	Phe Cys 930	Lys Tyr Gly Asn Leu 935
45	Ser Asn Phe Leu Arg 940	Val Lys Arg Asp	Thr Phe Asn Pro Tyr Ala 950
50	Glu Lys Ser Pro Glu 955	Gln Arg Arg Arg Phe 960	Arg Ala Met Val Glu 965
55	Gly Ala Lys Ala Asp 970	Arg Arg Arg Pro Gly 975	Ser Asp Arg Ala 980
60	Leu Phe Thr Arg Phe 985	Leu Met Gly Lys Gly 990	Ser Ala
65	Arg Arg Ala 995	Pro Leu Val Gln Glu 1000	Ala Glu Asp Leu Trp 1005
70	Leu Thr 1010	Met Glu Asp Leu Val 1015	Cys Tyr Ser Phe Gln 1020
75	Gly Met 1025	Glu Phe Leu Ala Ser 1030	Arg Lys Cys Ile His 1035
80	Arg Asp Leu	Ala Ala Arg Asn Ile Leu 1045	Ser Glu Ser Asp Ile 1050
85	Val Lys Ile	Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg 1060	Asp Ile Tyr Lys Asp 1065
90	Pro Asp Tyr		

ES 2 338 971 B1

	Val	Arg	Lys	Gly	Ser	Ala	Arg	Leu	Pro	Leu	Lys	Trp	Met	Ala	Pro
		1070					1075					1080			
5	Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Lys	Val	Tyr	Thr	Thr	Gln	Ser	Asp	Val	Trp
		1085					1090					1095			
10	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser
		1100					1105					1110			
15	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Glu	Glu	Phe	Cys	Gln	Arg	Leu
		1115					1120					1125			
20	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Met	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala
		1130					1135					1140			
25	Ile	Arg	His	Ile	Met	Gln	Ser	Cys	Trp	Ser	Gly	Asp	Pro	Lys	Ala
		1145					1150					1155			
30	Arg	Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Leu	Val	Glu	Ile	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu
		1160					1165					1170			
35	Gln	Gly	Gly	Gly	Trp	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Met	Ala	Leu
		1175					1180					1185			
40	His	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	Gln	Ala	Ser
		1190					1195					1200			
45	Thr	Thr	Ala	Leu	His	Ile	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Asp	Ser	Pro
		1205					1210					1215			
50	Pro	Ser	Met	His	Cys	His	Ser	Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Cys
		1220					1225					1230			
55	Val	Ser	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly
		1235					1240					1245			
60	Ser	Ser	Arg	Met	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Pro	Met	Thr	Pro	Thr
		1250					1255					1260			
65	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ser	Met	Asp	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Gly	Met	Val
		1265					1270					1275			
70	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Ser	Arg	His	Arg	Pro
		1280					1285					1290			
75	Glu	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	His	Met	Asp	Ile
		1295					1300					1305			
80	Pro	Arg	Gly	His	Pro	Asp	Pro	Gln	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Thr

ES 2 338 971 B1

	1310	1315	1320	
5	Gln Gly 1325	Ala Gln Gly Gly Lys 1330	Val Phe Tyr Asn Asn 1335	Glu Tyr Gly
10	Glu Val 1340	Ser Gln Pro Cys Thr 1345	Glu Gly Asp Cys Cys 1350	Pro Ser Ala
15	Gly Ser 1355	Thr Phe Phe Ala Asp 1360	Ser Ser Tyr	
20	<210> 3 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial			
25	<220> <223> cebador Flt45F			
30	<400> 3 tttgcggccg caggcttggc tgcttctctc			30
35	<210> 4 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial			
40	<220> <223> cebador Flt45R			
45	<400> 4 tttgcggccg cgccctcggt gtctgagttt g			31
50	<210> 5 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial			
55	<220> <223> cebador Flt43F			
60	<400> 5 tttgtcgaca ccctcacccg cacattc			27
65	<210> 6 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial			
	<220> <223> cebador Flt43R			

ES 2 338 971 B1

<400> 6

tttgtcgacg ggaagcaaga caccacct

28

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

- ⑪ ES 2 338 971
⑫ Nº de solicitud: 200802569
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2008
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006122141 A2 (BIOGEN IDEC MA INC.) 16.11.2006, todo el documento, especialmente resumen; páginas 2-12,18,19; ejemplos 1,2; reivindicaciones 1,4,5,7-12,15; figura 1.	1,6-13
A	EP 1692935 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23.08.2006, todo el documento, especialmente resumen; páginas 4,7; reivindicaciones 1-3,9; figura 1.	1,6-13
A	VEIKKOLA, T., et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. The EMBO journal. 15.03.2001. Vol. 20, nº 6, páginas 1223-1231. ISSN 0261-4189. Ver todo el documento, especialmente resumen; páginas 1224,1225,1230 (párrafo 3).	1,6-10,12,13
A	KARPANEN, T., et al. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. The American journal of pathology. Agosto 2006. Vol. 169, nº 2, páginas 708-718. ISSN 0002-9440. Ver todo el documento, especialmente resumen; páginas 709,710 y discusión.	1,3,6-10,12,13

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
29.04.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

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

C12N, A01K

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, EMBL All)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-13	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-13	SÍ
	Reivindicaciones		NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006122141 A2	16-11-2006
D02	EP 1692935 A1	23-08-2006
D03	VEIKKOLA, T., et al.	15-03-2001
D04	KARPANEN, T., et al.	08-2006

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

La presente solicitud describe y reivindica un mamífero no humano modificado genéticamente por introducción de la construcción IRES-EGFP-Luciferasa en la región 3' del gen Flt4 (VEGFR-3), y cuyas células expresan esta construcción con el patrón de expresión del receptor VEGFR-3. Reivindica también el vector que comprende la mencionada construcción génica, y el método para construir el mamífero transgénico reivindicado, así como las células aisladas en las que se ha introducido la construcción génica y las líneas celulares de ellas derivadas.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que divulguen la construcción génica reivindicada en la solicitud, ni el mamífero transgénico así generado, por lo que la invención se considera nueva e inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Los documentos del estado de la técnica considerados más cercanos a la solicitud, divulgan métodos para determinar expresión génica mediante la generación de ratones transgénicos por introducción de construcciones génicas en los mismos.

Así, el documento D01 describe la generación de un ratón transgénico para estudiar el estado de activación de los macrófagos en las células. Para ello se construye un vector de expresión que contiene una secuencia detectable (un gen "reporter" que codifica para EGFP-luciferasa) bajo control de un promotor específico de macrófagos (el promotor F4/80). El transgénico se consigue mediante inyección del vector en pronúcleos de ovocitos fertilizados de ratones C57B1/6, de forma que se puede seguir la actividad del promotor específico mediante la medida de las señales EGFP y/o luciferasa. Aunque el protocolo empleado es semejante al de la solicitud, y se emplean los mismos genes "reporter", en estos dos documentos se utilizan vectores de expresión diferentes y se persiguen fines totalmente distintos, como son la activación de macrófagos y la angiogénesis, por lo que D01 no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

En D02 se emplea igualmente un ratón transgénico para el estudio de enfermedades pulmonares humanas. En este caso se clona la secuencia IRES-EGFP delante del locus del gen fra-2, lo que permite detectar la actividad de este gen en el animal transgénico, que, de este modo, sirve como modelo para fibrosis pulmonar.

El documento D03 es un estudio del efecto del receptor VEGFR-3 y sus ligandos en las señales específicas de linfoangiogénesis. Aunque es la misma finalidad que la de la solicitud, en D03 las secuencias empleadas para generar el ratón transgénico son dos ligandos específicos de VEGFR-3, que se clonan bajo control de un promotor humano específico de epitelio (el promotor K14), y se inyectan directamente en ovocitos fertilizados de ratón. De esta forma, el promotor dirige la expresión del transgén a las células basales de la epidermis, y es en ellas donde se analiza el proceso de linfoangiogénesis. Dado que es este sistema no se emplean genes "reporter", la expresión de las secuencias clonadas se mide mediante análisis por Northern blot de los ligandos y sus receptores. Todas estas diferencias entre D03 y la solicitud llevan a considerar que este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Finalmente, el documento D04 describe otro estudio del papel de VEGFR-3 y sus ligandos en el proceso de linfoangiogénesis empleando ratones transgénicos. En este documento, se clonan los ligandos del receptor VEGFR-3 y una forma soluble de este receptor bajo control del promotor K14 y se generan adenovirus recombinantes, que se inyectan intraperitonealmente en ratones recién nacidos para estudiar el proceso de generación de vasos linfáticos en el periodo perinatal.

Se considera que todos estos documentos divulgan información general del campo técnico de la solicitud, por lo que ninguno de ellos afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.