



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 289**

② Número de solicitud: 200900217

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.08.2010

① Solicitante/s: **Fundació Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Fundació Privada**
Pg. Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES

② Inventor/es: **Meseguer, Anna;**
Tornavaca Lázaro, Olga y
Pascual Angulo, Gloria

④ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑤ Título: **Construcción génica que comprende el gen que codifica la proteína KAP y animal no humano modificado genéticamente con la misma.**

⑥ Resumen:

Construcción génica que comprende el gen que codifica la proteína KAP y animal no humano modificado genéticamente con la misma.

La presente invención se refiere a una construcción génica que comprende el gen de la proteína renal regulada por andrógenos (KAP) de ratón bajo el control de un promotor específico de expresión en tejido renal. Se describen sistemas celulares y animales no humanos modificados genéticamente que comprenden tal construcción y que resultan útiles para la evaluación de los mecanismos involucrados en la hipertensión arterial y diversos tipos de daño nefrológico.

ES 2 344 289 A1

DESCRIPCIÓN

Construcción génica que comprende el gen que codifica la proteína KAP y animal no humano modificado genéticamente con la misma.

La presente invención se refiere a construcciones génicas y a animales no-humanos o sistemas celulares que las incluyen, útiles para el estudio de la hipertensión y para el estudio del daño renal. La invención supone una herramienta para el análisis de la etiología de estos trastornos, así como para la consecución de compuestos aplicables en terapia.

Estado de la técnica anterior

La hipertensión constituye una patología de gran interés para la población por prevalecer en un índice elevado en los países desarrollados. Su estudio y la identificación de las causas resultan complejos debido a la variedad de etiologías y a la coexistencia de otras patologías. De todo ello, se deriva la necesidad de aportar nuevas herramientas que permitan elucidar las causas de la hipertensión.

La hipertensión, también denominada presión sanguínea elevada, HTN o HPN, es una condición médica en la que la presión sanguínea se encuentra elevada de un modo crónico. En el lenguaje coloquial, el término hipertensión se refiere generalmente a presión arterial. Existe la hipertensión esencial o primaria, por la que no se conoce ninguna causa médica; y la hipertensión secundaria, en la que la presión sanguínea alta es el resultado de otra condición tal como una enfermedad renal o tumoral. Aunque se desconocen exactamente las causas de la hipertensión esencial, se cree que en ella intervienen factores como la obesidad, la sensibilidad a la sal, la homeostasis de renina, la resistencia a la insulina, factores genéticos y la edad.

La proteína renal regulado por andrógenos (de aquí en adelante referida como “KAP”, “Kidney androgen-regulated protein”) es una proteína que se expresa de manera constitutiva en las células epiteliales del túbulo proximal de riñón. Tal como indica su nombre está regulada por hormonas sexuales y tiroideas. Aunque es la proteína más abundante en esta zona del riñón, su función y estructura son todavía desconocidas y parece controlada por múltiples y complejos factores.

La proteína KAP de ratón (*Mus musculus*) aparece entrada en la base de datos del NCBI con el número de acceso GenBank M22810. Presenta alta homología con las entradas GenBank AF319957 y BC008576 “kidney androgen regulated protein” humanas (*Homo sapiens*).

Se conoce que el promotor de esta proteína es un excelente direccionador para expresar en las células de los túbulos proximales de riñón cualquier gen de interés. Así, existen en la literatura publicaciones relativas a animales transgénicos que emplean el promotor de la proteína KAP (pKAP) para expresar en dicho tejido renal proteínas de interés. Concretamente, algunos de estos documentos se refieren a animales transgénicos útiles como modelos de hipertensión.

Así, el documento Ding *et al.*, “The Kidney Androgen-regulated Protein Promoter Confers Renal Proximal Tubule Cell-specific and Highly Androgen-responsive Expression on the Human Angiotensinogen Gene in Transgenic Mice”, the Journal of Biological Chemistry-1997, Vol. 272, pp. 28142-28148, muestra un ratón transgénico que contiene un fragmento de 1542 pares de bases del promotor endógeno que controla la proteína KAP de ratón fusionado con el gen humano de angiotensinógeno (HAGT). Con ello se consigue inducir la expresión de los componentes renina-angiotensina en el riñón. Los autores de esta publicación comprobaron que la expresión de HAGT y KAP en machos y en hembras estimuladas con testosterona se restringía a las células del los túbulos proximales. Se propuso entonces este modelo animal como el adecuado para estudiar el efecto del angiotensinógeno expresado en riñón sobre la presión arterial, y para activar el sistema renina-angiotensina (RAS) en riñón, independientemente de aquello que ocurra en la circulación sistémica.

Otro modelo animal aparece descrito en Guo *et al.*, “Development of Hypertension and Kidney Hypertrophy in Transgenic Mice Overexpressing ARAP1 Gene in the Kidney”, Hypertension, 2006, Vol. 48, pp. 453-459. Este documento demostraba que, ratones transgénicos que sobreexpresaban el cADN (ADN codificante) de la proteína asociada al receptor de tipo I de angiotensinógeno II (ARAP1) en los túbulos proximales de riñón, eran hipertensos. Además, los ratones presentaban alteraciones renales a nivel morfológico y funcional, tal como edemas, reabsorción y un engrosamiento de las células epiteliales de los túbulos proximales. Este hecho sugería que el ARAP1 renal desempeñaba un papel importante en el control de la presión sanguínea y de la función renal a través de la activación del sistema RAS.

Estos dos modelos animales resultan útiles para el estudio de la hipertensión en la que interviene el sistema RAS. También pueden aportar datos en lo que se refiere al daño nefrológico (hipertrofia, glomerulosclerosis, etc.) causado por el sistema RAS en riñón. Con este tipo de animales transgénicos, pueden visualizarse los efectos de la hipertensión relacionados con una disfunción del sistema RAS. Sin embargo, en dichos modelos no se puede asegurar que se elimine completamente la interferencia con el sistema RAS hepático u otros factores. En otras palabras, el sistema RAS no es específico del tejido renal ya que interviene también como sistema endocrino y está presente en tejidos tales como corazón, cerebro y sistema vascular. Por todo esto, los modelos descritos no serían del todo efectivos en el diseño de aproximaciones terapéuticas efectivas y específicas del daño renal o la hipertensión.

En aras de determinar alguna de las posibles funciones de la proteína KAP, se han llevado a cabo experimentos tal como el descrito por Cebrian *et al.* en "Kidney Androgen-regulated Protein Interacts with Cyclophilin B and Reduces Cyclosporine A-mediated Toxicity in Proximal Tubule Cells", Journal of Biological Chemistry-2001, Vol. 276, pp. 29410-29419. Este documento muestra un ensayo en el que mediante un cribaje de doble híbrido en levadura se determina que la proteína KAP interacciona específicamente con la ciclofilina B (CyPB), que es la proteína que se une a la ciclosporina A (CsA), un inmunosupresor. Ratones tratados con CsA presentan niveles más bajos de KAP. También se muestran datos en los que la sobreexpresión de KAP mediada por el promotor de tetraciclina en un modelo de células de túbulo proximal, disminuye los efectos tóxicos de la citada CsA. De todo ello, se concluye que KAP tiene un papel importante en la nefrotoxicidad mediada por CsA. Cebrian *et al.* (*supra*) señalan que con futuros ensayos de sobreexpresión y knock-out de KAP podrá elucidarse mejor el por qué de esta protección frente a la toxicidad de CsA mediada por KAP.

Se desprende entonces del estado de la técnica que, por un lado falta experimental que permita elucidar las funciones de esta proteína KAP en ratones, la cual presenta alta homología con algunas proteínas humanas, y por otro lado, son necesarios modelos animales alternativos para el estudio de la hipertensión y/o el daño renal que permitan estudiar las múltiples y variadas causas de estos desórdenes.

Explicación de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto que la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína KAP conlleva a la aparición de hipertensión y/o daño renal en modelos de ratones. Ventajosamente, con la construcción génica proporcionada en la presente invención puede obtenerse un modelo animal de hipertensión y/o daño renal que es independiente del sistema renina-angiotensina en riñón u de otros factores que conducen a este cuadro patológico, tal como la arteriosclerosis. Consecuentemente, en el nuevo modelo propuesto la hipertensión observada es debida únicamente a efectos intrínsecos de esta proteína de función desconocida hasta ahora, y que presenta alta homología con entradas de GenBank de secuencias proteicas humanas.

El hecho de poder desarrollar un modelo de hipertensión y/o daño renal como el de la presente invención, que se basa únicamente en la sobreexpresión de KAP, sin que se vean afectados los niveles de otras proteínas u hormonas (tal y como se demuestra más abajo) tiene una gran importancia en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas efectivas. Usando el modelo de la invención se pueden obtener fármacos que inhiban la expresión de KAP. Puesto que KAP se encuentra en niveles elevados únicamente en el caso de daño renal o hipertensión, el fármaco diseñado sería específico de estas disfunciones. El problema existente con los modelos del estado de la técnica es que se basaban en RAS. RAS se encuentra en niveles elevados cuando existe hipertensión o daño renal, pero dado que también forma parte del sistema endocrino o se expresa en otros tejidos el desarrollo de un fármaco específico de RAS no solo afectaría su expresión en riñón sino que también se verían afectados los niveles de expresión de la misma en otros sistemas y tejidos, lo cual puede desembocar, por ejemplo, en otras patologías o disfunciones hormonales.

Como se ilustra más abajo, la proteína KAP se encuentra aumentada sin tener que modificar los niveles de andrógenos (por inducción farmacológica o castración de los animales), por lo que los efectos observados se deben únicamente a la proteína KAP y no a otros genes también modulados por andrógenos. Este último hecho evita las interferencias de una activación generalizada de la respuesta a andrógenos que puede enmascarar los resultados. En cuanto al daño renal se refiere, el modelo propuesto es también específico de la expresión de la proteína KAP, evitándose las interferencias de otras proteínas de funciones ya conocidas.

En vista del estado de la técnica, resulta sorprendente que sea esta sobreexpresión de KAP en riñón la que conduzca a un cuadro fisiológico negativo, tal como el de la hipertensión y el daño nefrológico, cuando el experto en la materia esperaría un cuadro de protección renal, al menos en el caso de requerirse un tratamiento con inmunosupresores (Cebrian *et al.*, *supra*).

Por todo ello, en un primer aspecto la presente invención proporciona una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína renal regulada por andrógenos (KAP) de ratón bajo el control de un promotor específico de expresión en tejido renal.

El término "construcción génica" se refiere a la agrupación de un gen o genes que incluye el gen que codifica para la proteína KAP, el cual está unido operativamente a un promotor que controla su expresión. Estar "operativamente unido" debe entenderse como que la secuencia del gen está dispuesta a continuación de la secuencia del promotor o relativamente cerca en el caso que se incluyan fragmentos de restricción o elementos que aportan estabilidad a la construcción. La construcción génica puede comprender también pequeños fragmentos con secuencias útiles para adaptarla a los sistemas de expresión deseados y que el experto en la materia conocerá.

El término "promotor específico de expresión en tejido renal" hace referencia a una secuencia específica de ADN a la cual se le une la enzima ARN polimerasa para comenzar la transcripción de un gen y que permite la expresión de un gen de interés, en una o varias de las poblaciones celulares y estructuras que constituyen los tejidos renales, en respuesta a señales presentes en los citados tejidos, por ejemplo por interacción con un metabolito o compuesto específico.

ES 2 344 289 A1

La “secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína” comprende tanto secuencias que incluyen porciones de ADN codificantes y no codificantes (intrones, elementos reguladores de un gen, todas las unidades de un gen salvaje, etc.), así como secuencias que consisten únicamente en la parte codificante de un gen de interés, tal como un ADN complementario (cADN) derivado de una librería o de RNA mensajero.

5 En el contexto de la presente invención, debe entenderse por “tejido renal” cualquiera de las distintas asociaciones celulares estructuradas que se pueden localizar en riñón, tal como los túbulos proximales, el asa de Henle o la cápsula de Bowman.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende la construcción génica definida en el primer aspecto de la invención.

Debe entenderse por “vector de expresión”, o “construcción génica de expresión”, un plásmido que se emplea para introducir y expresar un gen específico en una célula de interés. Los vectores de expresión permiten la producción de grandes cantidades de ARN mensajero (mARN) estable. La proteína codificada por el gen es producida mediante la maquinaria de transcripción y traducción de la célula, una vez el vector está dentro de la misma. El plásmido se diseña de forma que contiene un promotor altamente activo, el cual provoca la producción de grandes cantidades de mARN. Un plásmido es una molécula de ADN extra-cromosómica, separada del ADN cromosómico de la célula y que se replica independientemente de éste. Generalmente los plásmidos son circulares y poseen dos hebras del ácido nucleico. Los plásmidos se encuentran de manera natural en muchas especies bacterianas, aunque también existen organismos eucariotas que los comprenden, como por ejemplo algún tipo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema celular que comprende la construcción génica según se define en el primer aspecto de la invención o el vector de expresión según se define en el segundo aspecto de la invención.

En el contexto de la presente invención debe entenderse por “sistema celular”, cualquier célula o conjunto de células convenientemente interrelacionadas para desarrollar una misma función. La célula es la mínima unidad estructural y funcional de un ser vivo. Dentro de los sistemas celulares debe incluirse los tejidos, los cultivos celulares y los cultivos celulares inmortales o líneas celulares. Ejemplos de sistemas celulares útiles para la presente invención son aquellas líneas o cultivos de células del túbulo proximal riñón. Otros sistemas celulares pueden ser óvulos que se emplearán seguidamente para la obtención de animales transgénicos.

30 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere un animal no humano modificado genéticamente que comprende la construcción génica definida más arriba; y que exhibe un fenotipo de hipertensión y/o daño renal.

Por “daño renal” debe entenderse cualquier condición patológica de tejido renal incluyéndose pero sin limitarse a glomerulosclerosis, nefritis, glomerulonefritis, nefritis intestinal, uropatía, errores en el transporte tubular renal, nefropatía de reflujo, necrosis papilar renal, fallo renal agudo o crónico, estenosis arterial renal, etc.

40 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método experimental no médico para la inducción de hipertensión y/o daño renal en un organismo o sistema celular experimentales, en donde se sobreexpresa la proteína KAP bajo un promotor específico de tejido renal.

45 Los “métodos experimentales no médicos” se refieren a procedimientos y tests realizados con sistemas celulares o animales de laboratorio, con fines experimentales, no terapéuticos, que permiten evaluar parámetros de productos de interés.

50 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método de cribaje de compuestos candidatos a reducir la hipertensión y/o daño renal que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto candidato con un sistema celular o con un animal no humano modificado genéticamente según se ha descrito anteriormente; y
- 55 b) determinar parámetros fisiológicos indicativos de tensión y/o daño renal; de modo que si el sistema celular o animal muestra una reducción de la tensión y/o del daño renal, el compuesto candidato es un compuesto útil para reducir la hipertensión y/o daño renal.

60 Finalmente, es también un aspecto de la invención un método de cribaje de compuestos candidatos a tratar la hipertensión y/o daño renal inducido por la sobreexpresión de la proteína KAP de ratón que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto candidato con un sistema celular o con un animal no humano modificado genéticamente según se ha descrito anteriormente; y
- 65 b) determinar los niveles de expresión de la proteína KAP;

de modo que si se determina una reducción de la expresión de la proteína KAP, esto es indicativo de que el compuesto es útil para tratar la hipertensión y/o daño renal.

Estos y otros objetos de la presente invención serán descritos con mayor detalle en la descripción detallada a continuación sin suponer una limitación de la invención. Siempre que no se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el significado utilizado usualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. A lo largo de la descripción y reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variaciones no excluyen otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán aparentes a aquellos expertos en la materia una vez analizada la descripción, o pueden derivarse de la práctica de la invención.

Además, la presente invención engloba todas las posibles combinaciones de grupos preferidos y particulares anteriormente descritos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se presentan las figuras que se acompañan en la presente invención a fin de ilustrar mejor los objetos de la misma sin por ello resultar limitativas.

La Fig. 1 corresponde a un mapa esquemático de la construcción denominada pKAP2-KAP, que equivale a la construcción génica con el cADN del gen de la proteína KAP controlado bajo su propio promotor y otras secuencias del gen del angiotensinógeno humano que permiten la correcta expresión del gen de interés, KAP en este caso, en las células del túbulo proximal en presencia de andrógenos. EcoRV-SpeI: sitio restricción endonucleasa II de *Escherichia Coli*, BamHI: sitio restricción reconocido por endonucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. NotI: sitio restricción reconocido por endonucleasa de *Nocardia otitidiscaviarum*. NdeI: sitio restricción reconocido por endonucleasa de *Neisseria denitrificans*.

Fig. 2. Caracterización fenotípica de los ratones transgénicos KAP. La Fig. 2(A) es una imagen del gel de agarosa para visualizar el análisis de expresión por RT-PCR no-cuantitativa del ARN total extraído de distintos tejidos de ratones transgénicos. Como control de la cantidad de RNA y para evaluar la integridad se emplea la determinación de RNA procedente de ciclofilina A (Cyp A) amplificada. La Fig. 2 (B) es una imagen de secciones de riñón embebidas en parafina, de ratón transgénico (KAP Tg) o control, reveladas con un anticuerpo monoclonal anti-KAP1 (20 µg/ml). C: control, M: marcadores peso molecular, K: riñón, B: cerebro, E: epidídimo, T: testículo, Li: hígado, Lu: pulmón, Mu: músculo, H: corazón.

La Fig. 3 muestra distintas imágenes que permiten evaluar histológica y patológicamente los ratones transgénicos KAP. En la Fig. 3.(A) se muestran secciones de riñones congelados de ratones transgénicos (KAP Tg) y ratones control teñidos con los reactivos Masson's Trichromic (Tr), eosina-Ematoxilina (H-E) y Periodic Acid Schiff (PAS). La Fig. 3(B) muestra una imagen por microscopía electrónica de barrido de la corrosión vascular. Para cada experimento se emplearon al menos 6 animales diferentes de cada grupo.

La Fig. 4 muestra diversos gráficos de barras en los que se evalúan distintos parámetros para el análisis hemodinámico de los ratones transgénicos KAP (KAP Tg). En Fig. 4(A) y (B) se comparan los valores de presión arterial sistólica (SAP) y diastólica (DAP) de ratones transgénicos y control de 6-8 meses de edad. Los resultados corresponden a la media de 6 animales por grupo. En la Fig. 4(C) se muestran las medidas radiotelemétricas de SAP, DAP y media de la presión arterial (MAP) de ratones transgénicos y control. Los resultados corresponden a la media de 6 animales por grupo. BP significa Presión arterial en milímetros de mercurio (mmHg).

Fig. 5. Excreción urinaria (UE) de ácido 20-hidroxicosatoenoico (20-HETE) y efectos del compuesto inhibidor N-hidroxi-N'-(4-n-butyl-2-metilfenil) formamidina (het0016) en la determinación de la presión arterial. En la Fig. 5 (A) se muestra la Excreción urinaria (UE) de 20-HETE en ratones transgénicos (KAP tg) o control en condiciones basales (Basal) o con previa administración del inhibidor de síntesis het0016. En la Fig. 5(B) se muestra el efecto de la administración de het0016 sobre la presión sistólica y diastólica de ratones transgénicos o control, respecto de los valores basales de estos parámetros. En todos los gráficos los resultados corresponden a la media de de 6 animales por grupo. En todos los casos, (*): Diferencias significativas entre controles y transgénicos. (#): Diferencias significativas entre animales vehículo (basales) o tratados con het0016.

Fig. 6. Diagramas de barras que muestran el estrés oxidativo en animales transgénicos y control, mediante la determinación de la excreción urinaria (UE) de los compuestos 8-iso-prostaglandina F2 alfa (PGF2α), 8-hidroxiguanosina (8-OHdG) y ácido tiobarbitúrico (TABA). (*): Diferencias significativas entre controles y transgénicos.

Fig. 7. Diagramas de barras que muestran la actividad de enzimas antioxidantes en animales transgénicos y control. En Fig. 7(A) se muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa total (SOD T), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD CuZn) y superóxido dismutasa citoplasmática (SOD-Mn) en Unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg prot). La Fig. 7(B) muestra los datos de actividad de la enzima catalas (CAT) en katalas por gramo de proteína (K/g prot); y la Fig. 7(C) la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa total (T-GSHPx) y glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Se-GSH-Px) en Unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg prot). Las muestras se analizaron por duplicado y se detallan los datos de ocho ratones por grupo. (*): Diferencias significativas entre controles y transgénicos (P≤0.05 - Mann-Whitney U-test).

Exposición detallada de la invención

Según se ha indicado anteriormente, la invención tiene por objeto una construcción génica que comprende el gen de la proteína renal regulada por andrógenos (KAP) de ratón bajo el control de un promotor específico de expresión en tejido renal. Esta construcción puede ser introducida en sistemas celulares o animales no humanos con la finalidad de obtener un modelo apto para el estudio de la hipertensión y/o el daño renal derivado de la sobreexpresión de esta proteína de ratón.

En una realización preferida, la construcción génica comprende como promotor el propio promotor de la proteína KAP de ratón (pKAP). Preferiblemente, dicho promotor tiene la secuencia SEC ID NO 2.

La construcción génica de la invención, preferiblemente, comprende la SEC ID NO. 1. Esta secuencia incluye el cADN codificante de la proteína KAP de ratón y 1542 pares de bases del promotor del gen de la proteína KAP, así como secuencias del gen del angiotensinógeno humano que no codifican para la proteína en cuestión (KAP) y que actúan como secuencias "enhancer" o incrementadoras de la expresión.

La construcción génica de acuerdo con la invención puede ser introducida en animales no humanos, que quedan modificados genéticamente. Para ello, se puede emplear: (a) la propia construcción desnuda, la cual puede ser microinyectada en células de un cultivo o de un animal no humano; (b) la construcción génica previamente insertada en un vector de expresión, que también se microinyecta en células de un cultivo o de un animal no humano; y (c) tanto la construcción desnuda como el vector (que incluye también la construcción) se pueden microinyectar, gradual o simultáneamente, a las células de un cultivo o de un animal no humano.

Para la obtención del modelo animal de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención se puede seguir el siguiente protocolo: (a) diseñar una construcción génica según el primer aspecto de la invención; (b) microinyectar la construcción génica en un pronúcleo masculino de un óvulo fertilizado de ratón; (c) cultivar el óvulo obtenido; (d) trasplantarlo a un oviducto de un ratón hembra pseudopreñada; y (e) seleccionar de entre la progenie aquellos animales que contienen el cADN de KAP.

En una realización preferida, el animal no humano empleado es un ratón (*Mus musculus*) y la construcción génica desnuda se microinyecta en el pronúcleo masculino de un óvulo fertilizado de ratón. El óvulo obtenido se cultiva y finalmente trasplanta en el oviducto de un ratón hembra pseudopreñada. Finalmente, se selecciona a la progenie de esta hembra que contiene la citada construcción en su genoma. Según se detalla en los ejemplos adjuntos, esta progenie presenta un cuadro fisiológico de hipertensión y de daño renal.

También de acuerdo con los ejemplos adjuntos, la invención proporciona un método experimental no médico de inducir hipertensión y/o daño renal en ratones que sobreexpresan la proteína KAP bajo el control de su propio promotor (pKAP). Este método es también aplicable a sistemas celulares, por ejemplo células de alguna estructura del riñón, las cuales pueden ser modificadas genéticamente *in vitro* para que sobreexpresen la proteína KAP, aún bajo el control de otro promotor específico para las mismas, y cuyo fenotipo sea equivalente a daño nefrológico. Otros promotores específicos de tejido renal incluirían el promotor del gen de la cadherina específica de riñón, el promotor del cotransportador de glucosa/ Na⁺ de alta capacidad (Sgt2), etc. Como bien entenderá un experto en la materia, algunos cambios fenotípicos observados en un cultivo de tejido renal son a la vez indicativos de problemas en la presión sanguínea por el hecho que el riñón es uno de los órganos más implicados en el control de la citada presión.

Con un sistema celular u organismo animal no humano modificado genéticamente con la construcción génica de la invención, puede llevarse a cabo un método de cribaje de compuestos candidatos a reducir la hipertensión y/o daño renal. El citado método se basa en el hecho de testar o administrar el compuesto candidato en el sistema celular o el animal transgénico; y en determinar aquellos parámetros fisiológicos indicativos de tensión y/o daño renal. Ejemplos de dichos parámetros incluyen la medición de la presión sanguínea, determinación de niveles de marcadores de estrés oxidativo, determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, determinación de los niveles de creatinina, glucosa, proteína y/o sales en orina, visualización de biopsias de tejido renal, o mezclas de los mismos. Si el sistema celular u organismo animal no humano muestra una reducción de la tensión y/o del daño renal, el compuesto candidato es un compuesto apto para tal o tales usos.

Un ejemplo de que los sistemas celulares y animales de la invención pueden emplearse en un método de cribaje es el que se describe en el Ejemplo 4 (ver a continuación), donde la administración del compuesto het0016 provoca la disminución de la síntesis del vasoconstrictor 20-HETE y la presión sistólica y diastólica de los ratones.

Alternativamente, el método de cribaje puede llevarse a cabo para localizar compuestos candidatos a tratar la hipertensión y/o daño renal inducido por la sobreexpresión de la proteína KAP de ratón, determinándose precisamente los niveles de expresión de KAP, una vez administrado el compuesto a un animal no humano o sistema celular. Si se detecta una reducción de la expresión de la proteína KAP, esto es indicativo de que el compuesto es útil para tratar la hipertensión y/o daño renal. El experto en la materia conocerá las técnicas experimentales para llevar a cabo la determinación de los niveles de expresión de la citada proteína. Ejemplos de ellos incluyen técnicas de cuantificación de mRNA (RT-PCR), técnicas de cuantificación de proteínas, tal como electroforesis de proteínas, inmunoensayos (ELISA, RIA), etc.

Aunque en los ejemplos adjuntos se detallan los resultados obtenidos con una construcción que se correspondía con la SEC ID NO 1, un experto en la materia entenderá que forma parte también de la invención el empleo de construcciones análogas, las cuales, sin dejar de comprender aquellos componentes esenciales para la producción de KAP sobreexpresada, permitan evaluar y seguir mejor los resultados. Así, se contempla la posibilidad que el gen que codifica para la proteína KAP y que está insertado en la construcción, de lugar a una proteína KAP modificada con epítotos u otro tipo de marcadores que permitan seguir con mayor facilidad la sobreexpresión de la misma.

Ejemplo 1

Generación ratón transgénico

Partiendo de RNA de riñón de ratones macho C57BL/6 y mediante RT-PCR (INVITROGEN life technologies SuperScript One-Step RTPCR System) se obtuvo el cADN completo de la proteína KAP con extremos NotI modificados y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (INVITROGEN life technologies). El cADN de KAP modificado se clonó seguidamente en los lugares NotI de un vector conocido como vector pKAP2. El vector pKAP2 dirige la expresión génica heteróloga a las células del túbulo proximal renal de modo específico y dependiente de andrógenos.

Este vector pKAP2 se genera según se describe por Lavoie *et al.* en "Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule", American Journal of Physiology/Renal Physiology-2004, Vol. 286, pp. 965-971. Básicamente, este vector pKAP2 deriva de una construcción que contiene el promotor del gen de la proteína KAP operativamente unido al gen del angiotensinógeno humano (pKAP-hAGT). Esta construcción se modifica para introducir un sitio de restricción NotI aguas abajo del promotor KAP (pKAP) a la vez que se elimina el exón II que codifica por el hAGT. Para ello, se amplifica el gen de hAGT y en él se introduce un sitio de restricción NotI a 42 pares de bases del final del citado exón II. El producto de PCR se inserta en el vector pCR2.1 (INVITROGEN life Technologies), digerido con SpeI y NotI, y subclonado en el vector pGEM5. Seguidamente se amplifica el promotor KAP y se añade un sitio de restricción NotI. Este nuevo producto de PCR se inserta en el vector pCR2.1 (INVITROGEN life Technologies), digerido con NdeI y NotI, y se subclona en el vector pGEM5 que contiene el gen del hAGT modificado.

El transgén final o construcción génica de 12,000 kb, pKAP2-KAP (SEC ID NO 1) detallado en la Fig. 1, fue liberado por digestión con NdeI y SpeI, separado mediante electroforesis en gel de agarosa y recuperado del gel por extracción. Todos los lugares de unión al vector se verificaron por secuenciación.

La construcción génica pKAP2-KAP (SEC ID NO 1) aislada se microinyectó en embriones fertilizados de ratón en estado de una célula, obtenidos a partir de hembras superovuladas C57BL/6J x SJL/J (B6SJL F2) utilizando protocolos estándar. La presencia del transgén se identificó por Southern Blot de ADN genómico procedente de cola y digerido con EcoRI, utilizando como sonda la misma construcción pKAP2-KAP marcada con ³²P. Tras verificar que, tanto el Southern Blot como el análisis por PCR de ADN genómico procedente de cola, generaban resultados idénticos, la identificación de la descendencia transgénica se llevó a cabo mediante PCR. Como controles de los estudios aquí descritos se utilizaron hermanos de la camada no transgénicos, iguales en edad y sexo.

Todos los animales recibieron dieta estándar y agua *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo con estándares institucionales, que abarcan los requerimientos establecidos por el Gobierno Español y la Comunidad Europea (Real Decreto 1201/2005: B.O.E. n° 252.21/10/2005).

Análisis de la expresión de RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR):

Se extrajo RNA total de diferentes tejidos de los ratones, siguiendo el método del tiocianato de guanidinio/fenol-cloroformo, seguido por extracción de mRNA (Amersham-Pharmacia Biotech, Europe GmbH). Las reacciones de RT-PCR no cuantitativa se llevaron a cabo bajo condiciones lineales con respecto a la cantidad de RNA y al número de ciclos de amplificación. Las reacciones de PCR resultaron ser lineales para 18-24 ciclos. Para la detección de los transcritos de KAP (RNA mensajero de KAP) se utilizaron los siguientes cebadores: cebador directo 5'-TTGCCTTAACCCTACTAAAGC-3' (SEC ID NO 3) y cebador reverso 5'-GGAAGTAGGGGAGACTGG-3' (SEC ID NO 4). Como control de la cantidad e integridad del RNA se amplificó la Ciclofilina A. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2%. En la Fig. 2(A), puede apreciarse una imagen del gel obtenido para los extractos titulares de los ratones transgénicos. Como control se detectó la banda correspondiente a la proteína ciclofilina A (CypA). Puede apreciarse en esta Fig. 2(A) que únicamente aparece una banda correspondiente a la expresión de la proteína KAP en el carril de tejido de riñón (K). Este hecho demuestra que la construcción génica pKAP2-KAP (SEC ID NO 1) es específica de este órgano.

Los experimentos cuantitativos de RT-PCR a tiempo real se realizaron utilizando el sistema de PCR con sondas Taqman fluorogénicas. La reacción de RT se llevó a cabo utilizando el kit Gene Amp Gold RNA PCR reagent kit (Applied Biosystems), utilizando como molde 1 mg del extracto de RNA y el primer reverse en una mezcla total de reacción de 20 mL. El cADN así obtenido se utilizó como molde para la PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa se realizó utilizando sondas Taqman gen-específicas Cyp4A14, Cyp2D9, Cyp4A10 y Cyp4A12. La señal fluorescente se monitorizó mediante el sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Se utilizó la Master Mix Taqman Universal (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de ciclos: un paso inicial de 50°C durante

ES 2 344 289 A1

2 minutos, 95°C durante 10 minutos y ciclos dobles de 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto, durante 40 ciclos. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los análisis post-PCR se llevaron a cabo utilizando el software GeneAmp 5700 SDS.

5 La distribución de tejido transgénico, según se desprende de los datos de RT-PCR de la Fig. 2(A), mostró expresión de la proteína KAP únicamente en tejido renal, en donde los niveles de la proteína KAP eran el doble en comparación con aquellos detectados para los animales control (datos control no mostrados).

10 El análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpos específicos de la proteína KAP, según se desprende de la Fig. 2(B), indica que la expresión de esta proteína se restringe además a los túbulos proximales, tal como se esperaba de la construcción pKAP2-KAP (SEC ID NO 1). Para este ensayo, se siguieron los protocolos de inmunohistoquímica y microscopía confocal siguientes:

15 Secciones de riñón de 3 mm de espesor embebidas en parafina y fijadas en formalina se desparafinaron, rehidrataron y se sometieron a un tratamiento para exponer el antígeno. Para ello, las secciones se calentaron en una solución citrato (pH 6.0; Dako A/S Copenhagen, Denmark) en un horno microondas de 800 W durante aproximadamente 5 minutos y un nivel de potencia máxima. El nivel de potencia del microondas se redujo posteriormente al 10% y los cortes se sometieron a calor continuo en este nivel durante 15 minutos adicionales. La actividad peroxidasa endógena se inactivó al 20 10% en PBS 1x (pH 7.4) durante 60 minutos y fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón primario anti-KAP (20 mg/ml) diluido en PBS, toda la noche a 4°C, según se describe en Cebrián *et al.*, "Kidney Androgen-regulated Protein Interacts with Cyclopilin B and Reduces Cyclosporine A-mediated Toxicity in Proximal Tubule Cells", Journal of Biological Chemistry-2001, Vol. 276, pp. 29410-29419. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el método del polímero marcado con peroxidasa y conjugado con una IgG de cabra anti-ratón (Dako EnVision System; 25 Dako A/S Copenhagen, Denmark) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los productos de la inmunoreacción se visualizaron utilizando el sustrato 3,3'-diaminobencidina. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina Dako REALTM (Dako A/S Copenhagen, Dinamarca).

30 Las secciones de riñón se incubaron con anticuerpo de conejo anti-ratón para el colágeno IV (Chemicon Internacional, Temecula California, USA) a una dilución de 1:100. Como anticuerpo secundario para el análisis de microscopía confocal de barrido láser (TCS SP2; Leica Microsystems Gmb, Heidelberg, Germany) se utilizó IgG biotilada anti-conejo, el conjugado Streptavidina Alexa Fluor 488 como fluorocromo (Molecular Probes) y yoduro de propidio para la contratiñencia nuclear (Sigma-Aldrich).

35 Ejemplo 2

Determinación histológica y patológica de los ratones

40 Con la finalidad de caracterizar de manera más amplia los ratones transgénicos obtenidos con la construcción génica de la invención, se llevó a cabo un estudio histológico y patológico de los mismos.

45 Para la determinación histológica se extrajeron los riñones de los ratones y se fijaron en formalina al 10%. Para el examen histológico, 4 mm de secciones congeladas de riñón se tiñeron con eosina-Ematoxilina (H-E), Ácido de Schiff periódico (Periodic Acid Schiff (PAS)) y el compuesto Tricrómico de Masson (Masson's Trichromic (Tr)), siguiéndose los protocolos estándar para histoquímica.

50 Los árboles vasculares renales se obtuvieron utilizando Mercocox (Japan Vilene Co.; proporcionado por Ladd Research Industries, Williston, Vt, USA). La aorta abdominal se diseccionó y canuló. Tras la polimerización, las muestras se colocaron en agua jabonosa y posteriormente se dejaron macerar en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Una vez disecados, los árboles fueron recubiertos con partículas de oro y observados por microscopía electrónica de barrido en un Hitachi S-570 a un voltage de aceleración entre 10-15 kV.

55 El análisis histopatológico utilizando las tinciones de hematoxilina/eosina, PAS y tricrómico de Masson, no mostró lesiones tubulares significativas pero reveló diferentes alteraciones glomerulares que incluían dilatación de la arteriola aferente y glomeruloesclerosis focal en los animales transgénicos (KAP Tg) respecto de los controles (Fig. 3(A)). La glomeruloesclerosis es un endurecimiento de ciertas partes del glomérulo de riñón, en el cuál se acumula un exceso de fibras de tejido conectivo que lo dejan total o parcialmente no operativo. Esto último fue posteriormente corroborado por aumento de colágeno tipo IV en la membrana basal y aumento de los niveles de colágeno tipo I y fibronectina en los extractos de riñón completo (datos no mostrados). Las diferencias en marcadores de fibrosis por ensayos de transferencia western (western blot) en extractos de riñón entero fueron menos pronunciadas que las observadas por 60 microscopía confocal en glomérulos seleccionados, probablemente debido a la contribución de tejido no afectado en los extractos de riñón entero. La microscopía electrónica de barrido en los árboles vasculares renales, que puede visualizarse en la Fig. 3(B) reveló un colapso capilar severo en los glomérulos afectados de los animales transgénicos.

65 Puede entonces concluirse de los datos experimentales arriba descritos que se observó glomeruloesclerosis en los tejidos de los animales transgénicos y no en los de los animales no transgénicos (control).

Ejemplo 3

Medida de presión sanguínea

5 Otro parámetro que se evaluó en los animales del Ejemplo 1 fue la presión sanguínea. Para ello, se determinó la presión arterial por telemetría en animales sin anestesia o en restricción de movimiento para evitar los efectos interferentes de estos dos parámetros en la presión arterial. La medida de la presión sanguínea por sistema de radiotelemetría se llevó a cabo con un catéter implantado en la arteria carótida de cada ratón. El catéter estaba unido a un transductor de presión, un transmisor y una batería, todo ello encapsulado en un monitor electrónico microminiaturizado e im-
10 plantable (PA-C20, Data Sciences International, St. Paul, MN). Cada uno de los animales se dispusieron en una jaula de polipropileno y se sometieron a un ciclo de luz y oscuridad con intervalos de 12 horas, a la vez que se alimentaban *ad libitum*. Al menos tres días después, las jaulas se colocaron sobre un receptor de radio en un ambiente silencioso y se tomaron varias veces la medida de la presión arterial diastólica y sistólica, así como el latido del corazón (pulso).

15 En la Fig. 4 se muestran unos diagramas de barras con los resultados de los distintos parámetros para el análisis hemodinámico de los ratones transgénicos KAP (KAP Tg). En la Fig. 4(A) y (B) se comparan los valores de presión arterial sistólica (SAP) y diastólica (DAP) de ratones transgénicos y control de 6-8 meses de edad. Los resultados corresponden a la media de 6 animales por grupo. En la Fig. 4(C) se muestran las medidas radiotelemétricas de SAP, DAP y media de la presión arterial (MAP) de ratones transgénicos y control. Los resultados corresponden a la media
20 de 6 animales por grupo. BP significa presión sanguínea en milímetros de mercurio (mm Hg).

Las medidas de presión arterial sistólica y diastólica en los animales transgénicos, según se desprende de esta Fig. 4, revelaron que estos animales eran hipertensos. En estos animales modificados genéticamente el incremento de la presión arterial se produjo a los 4-6 meses, estabilizándose a los 7-10 meses de edad. Los animales transgénicos pa-
25 saban a ser hipertensos de manera dependiente del tiempo y estos datos indican que la proteína KAP estaba implicada en los mecanismos de control de la presión sanguínea.

Ejemplo 4

30

Análisis de la función renal

Para evaluar aquellos parámetros indicativos de la funcionalidad de los tejidos renales en los animales del Ejemplo 1, se evaluaron por un lado los niveles de creatinina en orina y plasma. También se determinaron las concentraciones
35 de electrolito urinario, proteína y glucosa.

Para ello, se obtuvo orina a partir de ratones mantenidos en jaulas metabólicas durante 24 h. La orina se recolectó en cilindros graduados conteniendo 100 ml de azida sódica al 0.1% (para minimizar el crecimiento bacteriano) y 1 ml de aceite mineral (para evitar la evaporación). Las muestras de sangre (150 ml) se obtuvieron de la vena caudal de
40 los animales sometidos a estudio con el fin de medir la concentración de creatinina en el plasma. Las concentraciones de urea y creatinina plasmática se determinaron mediante el método de la reacción de Jaffé modificado. Las concentraciones de electrolitos urinarios, proteína y glucosa se midieron utilizando un autoanalizador Hitachi y siguiendo protocolos estándar.

45 Según se desprende de la tabla adjunta, se observó glucosuria y proteinuria en los animales transgénicos, mientras que las concentraciones de potasio o creatinina en urea o plasma y el aclaramiento de creatinina, no se veían modificados en gran medida respecto de los controles.

50

TABLA 1

Análisis de la función renal en animales transgénicos respecto animales control

	Control (n=5)	KAT Tg (n=7)
55 Aclaramiento de creatinina (ml/24h)	0,63 ± 0,17	0,56 ± 0,12
60 Glucosa en orina (mg/24h)	0,072 ± 0,012	0,114 ± 0,017
Preteína en orina (mg/24h)	9,36 ± 1,66	14,01 ± 2,35
Creatinina en suero (mg/dl)	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01
65 Potasio en sangre (mval/l)	9,49 ± 1,06	10,31 ± 0,35

ES 2 344 289 A1

Con la finalidad de caracterizar mejor el funcionamiento renal de los ratones transgénicos, se evaluaron también las concentraciones de varios marcadores de estrés oxidativo renal, así como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes.

5 En la Fig. 5 se muestran los resultados de la excreción urinaria (UE) de ácido 20-hidroxicosotetraenoico (20-HETE), un metabolito vasoconstrictor, y los efectos de su compuesto inhibidor N-hidroxi-N'-(4-n-butil-2-metilfenil) formamida (het0016) en la presión arterial de los ratones.

10 El compuesto 20-HETE es un metabolito vasoconstrictor que actúa a través de la hidroxilación del ácido araquidónico. Se conoce que, al menos parcialmente, el compuesto 20-HETE estimula la producción de especies oxidativas reactivas a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa. Según se desprende de la Fig. 5(A), en los animales transgénicos se observaron unos niveles de excreción basales (Basal) de 20-hidroxicosotetraenoico (20-HETE) significativamente mayores que en los animales control. Además, cuando se trataban dichos animales transgénicos con el inhibidor N-hidroxi-N'-(4-n-butil-2-metilfenil) formamida (het0016), que es un inhibidor de la síntesis del vasoconstrictor 20-HETE, este metabolito quedaba completamente eliminado. Este hecho significaba que el citado vasoconstrictor estaba implicado con el incremento de la presión arterial observada en los ratones transgénicos. Evidentemente, el efecto del inhibidor het0016 también se observaba, de manera análoga, en los animales control.

20 Paralelamente a la excreción urinaria de 20-HETE, también se determinó la presión sistólica y diastólica de los ratones. Según se desprende de la Fig. 5(B), la presión sanguínea de los animales disminuyó una vez administrado el inhibidor het0016, hecho que vuelve a indicar que la sobreexpresión de la proteína KAP está asociada con un incremento en la producción del metabolito HETE.

25 Otros marcadores de estrés oxidativo renal que se evaluaron en orina fueron los compuestos 8-iso-prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), 8-hidroxi-guanosina (8-OHdG) y ácido tiobarbitúrico (TABA), así como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes.

30 En cuanto a los datos extraídos del análisis de estrés oxidativo (medición de los niveles de marcadores específicos), se deduce de la Fig. 6 que los niveles de excreción de los compuestos 8-iso-prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), 8-hidroxi-guanosina (8-OHdG) y ácido tiobarbitúrico (TABA), se encontraban significativamente elevados en los animales transgénicos y además correlacionaban con un mayor daño oxidativo en los riñones de estos animales, tal como se desprende del daño observado a nivel de ADN mitocondrial (mtADN). Estos resultados de ADN mitocondrial, no mostrados, soportan el concepto que la hipertensión inducida por la sobreexpresión de KAP se basa en el estrés oxidativo que, en parte, proviene del riñón.

35 Otro indicador del hecho que las funciones del riñón en los animales transgénicos estaban comprometidas, es que de una manera general la actividad de las enzimas antioxidantes se ve reducida en estos animales. Así, también se determinaron las actividades de las enzimas superóxido dismutasa total (SOD T), citoplasmática (SOD-Mn) y mitocondrial (SOD CuZn), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa total (T-GSHPx) y dependiente de selenio (Se-GSH-Px).

40 Para la determinación de las actividades enzimáticas el tejido renal se homogeneizó en tampón PBS, se sonicó durante 1,5 minutos, se centrifugó y finalmente se recolectó el sobrenadante. La actividad de SOD T se determinó por el método de McCord y Fridovich, midiéndose la inhibición de la reducción del citocromo c por un radical superóxido. La actividad de SOD Mn se midió en presencia de 10 mM KCN. La actividad de glutatión peroxidasa (GSHPx) se determinó utilizando el método de Lawrence y Buró, en el cual la actividad de esta enzima está acoplada a la oxidación de NADPH por la glutatión reductasa y se monitoriza a 340 nm. Finalmente, la actividad de CAT se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método de Aebi, monitorizándose la degradación de H₂O₂ a 240 nm.

50 Los resultados observados se muestran en la Fig. 7, que en diversos diagramas de barras presenta la actividad de enzimas antioxidantes en animales transgénicos y control. En la Fig. 7(A) se muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa total (SOD T), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD CuZn) y superóxido dismutasa citoplasmática (SOD-Mn) en Unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg prot). La Fig. 7(B) muestra los datos de actividad de la enzima catalasa (CAT) en katalas por gramo de proteína (K/g prot); y la Fig. 7(C) la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa total (T-GSHPx) y glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Se-GSH-Px) en Unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg prot). Las muestras se analizaron por duplicado y se detallan los datos de ocho ratones por grupo. (*): Diferencias significativas entre controles y transgénicos (P \leq 0.05 - Mann-Whitney U-test).

60 De esta Fig. 7 se desprende que en los animales transgénicos el estrés oxidativo no estaba relacionado únicamente con un supuesto incremento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa a través de la producción de 20-HETE, sino que también contribuyen las deficiencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y catalasa del tejido renal. Por el hecho que esta deficiencia enzimática no se observó para la superóxido dismutasa, se postula que es el compuesto H₂O₂ y no el anión su peróxido (O₂⁻) quien puede estar afectando a dichos animales transgénicos.

Ejemplo 5

Análisis de expresión génica diferencial en micromatrices

5 Con la finalidad de caracterizar mejor el sistema, se realizaron además análisis transcriptómicos utilizándose micromatrices Affymetrix. Los genes que se expresaban de manera diferencial entre los animales transgénicos y los controles, reclasificaron en grupos funcionales en base a su función molecular según la base de datos Gene Ontology.

10 Todos estos genes diferencial mente expresados en los ratones transgénicos se correspondían con genes de metabolismo lipídico (14.8%), proliferación celular (15.8%), migración y adhesión celular (19.8%), transporte tubular renal (8.9%), respuesta inmune (11.8%), metabolismo lipídico (10.8%), respuesta a estrés (5.9%) y genes de función desconocida (11.8%).

15 Algunos de los genes de metabolismo lipídico que se expresan de manera significativamente diferente correspondían al polipéptido 14 de la subfamilia a dentro de la familia 4 del citocromo P450 (Cyp4a14), a la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (Mttp), a la acetil-conezima A aciltransferasa 1B, a la prostaglandina D2 sintasa, entre otros.

20 De todos los ejemplos presentados, debe deducirse que los animales no humanos transgénicos (KAP Tg), concretamente ratones, muestran que la sobreexpresión de la proteína KAP provoca hipertensión y alteraciones severas en riñón. La hipertensión y el incremento de la presión en los capilares glomerulares conducen a un cuadro de glomeruloesclerosis, proteinuria y desarrollo de enfermedades crónicas renales. Considerando que la incidencia de estas disfunciones renales asociadas con enfermedades cardiovasculares es cada vez mayor en los países industrializados, el objeto de la presente invención supone un gran avance como herramienta para el estudio de las causas de estas
25 alteraciones y para el futuro desarrollo de nuevos fármacos más específicos para su tratamiento.

De hecho, se postula que tanto el déficit de proteína KAP, por ejemplo debido al tratamiento con inmunosupresores, como su sobreexpresión, por ejemplo con un cuadro fisiológico como el del modelo propuesto en la invención, son nocivos para el riñón. Consecuentemente, parece que los niveles de proteína KAP deben mantenerse en rangos
30 fisiológicos estrictos para el buen funcionamiento del riñón, lo que explica el estricto control al que está sometida la expresión de su RNA mensajero, así como el estricto control post-traduccional que también viene observándose.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína renal regulada por andrógenos (KAP) de ratón bajo el control de un promotor específico de expresión en tejido renal.
2. Construcción génica de la reivindicación 1, donde el promotor específico de expresión en tejido renal es el promotor de la proteína KAP.
- 10 3. Construcción génica de la reivindicación 2, en donde el promotor tiene la secuencia SEC ID NO 2.
4. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene la SEC ID NO. 1.
5. Vector de expresión que comprende la construcción génica definida en las reivindicaciones anteriores.
- 15 6. Sistema celular que comprende la construcción génica según se define en las reivindicaciones 1 a 4 y/o un vector según se define en la reivindicación 5.
- 20 7. Animal no humano modificado genéticamente que comprende la construcción génica definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y que exhibe un fenotipo de hipertensión y/o daño renal.
8. Animal no humano modificado genéticamente de la reivindicación 7, donde el animal es un ratón.
- 25 9. Método experimental no médico para la inducción de hipertensión y/o daño renal en un organismo o sistema celular experimentales, en donde se sobreexpresa la construcción génica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
10. Método de cribaje de compuestos candidatos a reducir la hipertensión y/o daño renal que comprende:
- 30 a) poner en contacto el compuesto candidato con un sistema celular según la reivindicación 6 o con un animal no humano modificado genéticamente según las reivindicaciones 7 a 8; y
- b) determinar parámetros fisiológicos indicativos de tensión y/o daño renal; de modo que si el sistema celular o animal muestra una reducción de la tensión y/o del daño renal, el compuesto candidato es un compuesto útil en la reducción de la hipertensión y/o daño renal.
- 35 11. Método de cribaje de la reivindicación 10, donde los parámetros fisiológicos indicativos de tensión y/o daño renal se seleccionan del grupo que consiste en: medición de la presión sanguínea, determinación de niveles de marcadores de estrés oxidativo, determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, determinación de los niveles de creatinina, glucosa, proteína y/o sales en orina, o mezclas de los mismos.
- 40 12. Método de cribaje de compuestos candidatos a tratar la hipertensión y/o daño renal inducido por la sobreexpresión de la proteína KAP de ratón que comprende:
- 45 a) poner en contacto el compuesto candidato con un sistema celular según la reivindicación 6 o con un animal no humano modificado genéticamente según las reivindicaciones 7 a 8; y
- b) determinar los niveles de expresión de KAP;
- 50 de modo que si se determina una reducción de la expresión de la proteína KAP, esto es indicativo de que el compuesto es útil para tratar la hipertensión y/o daño renal.

55

60

65

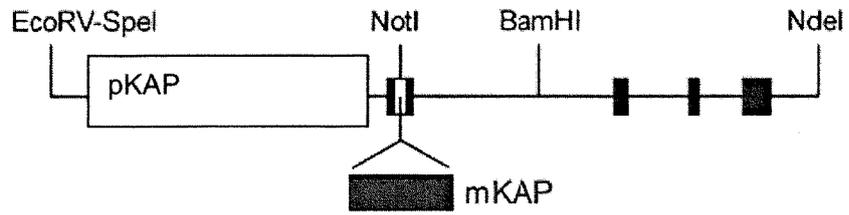


FIG. 1

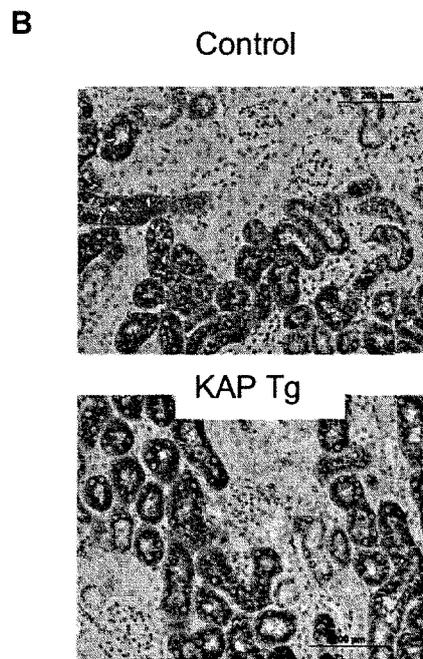


FIG. 2

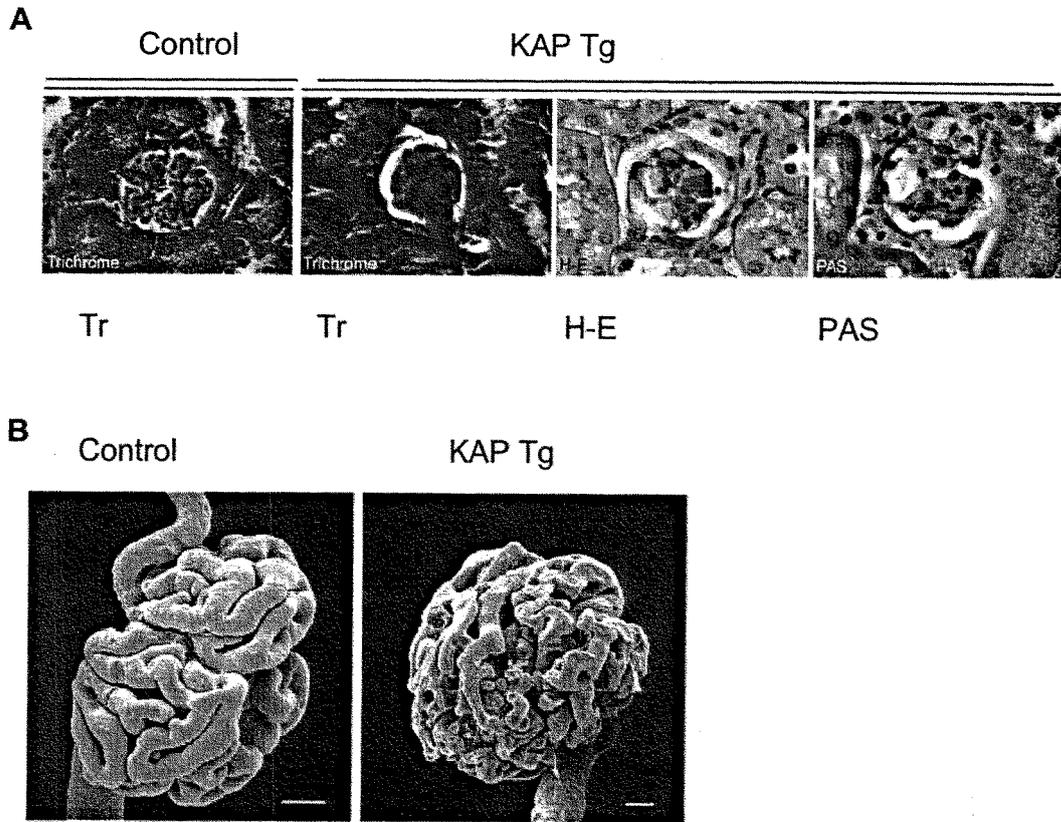


FIG. 3

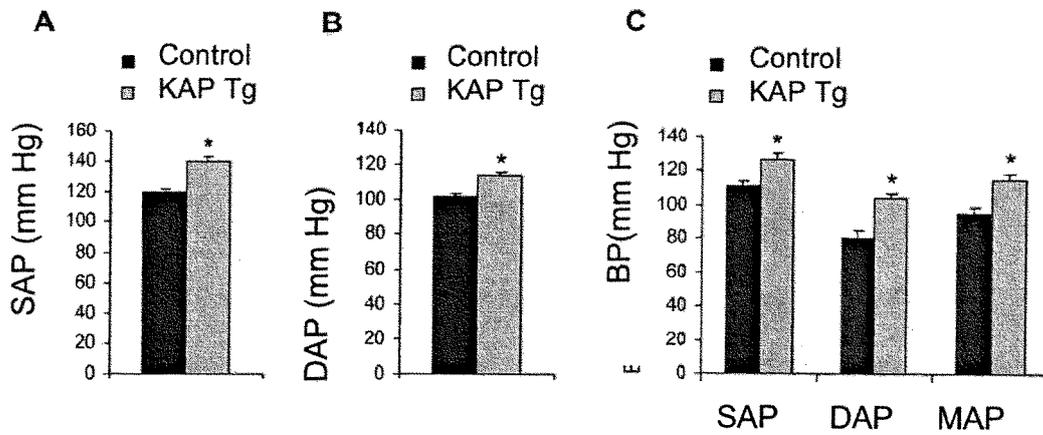


FIG. 4

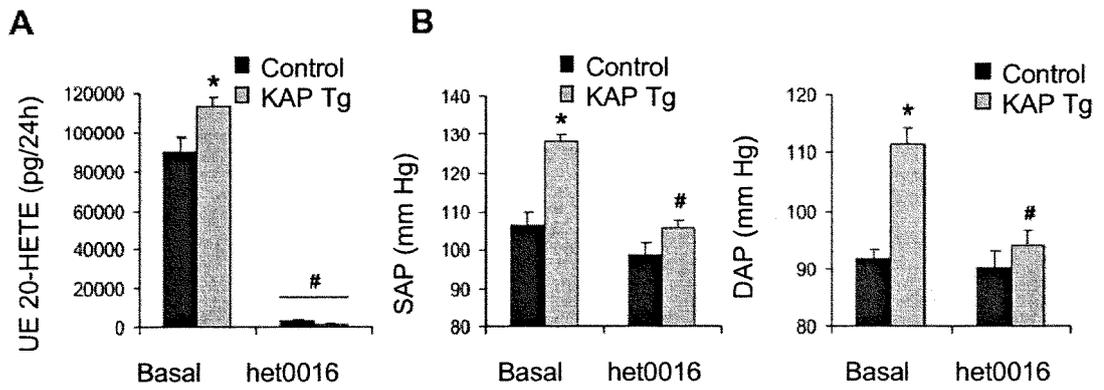


FIG. 5

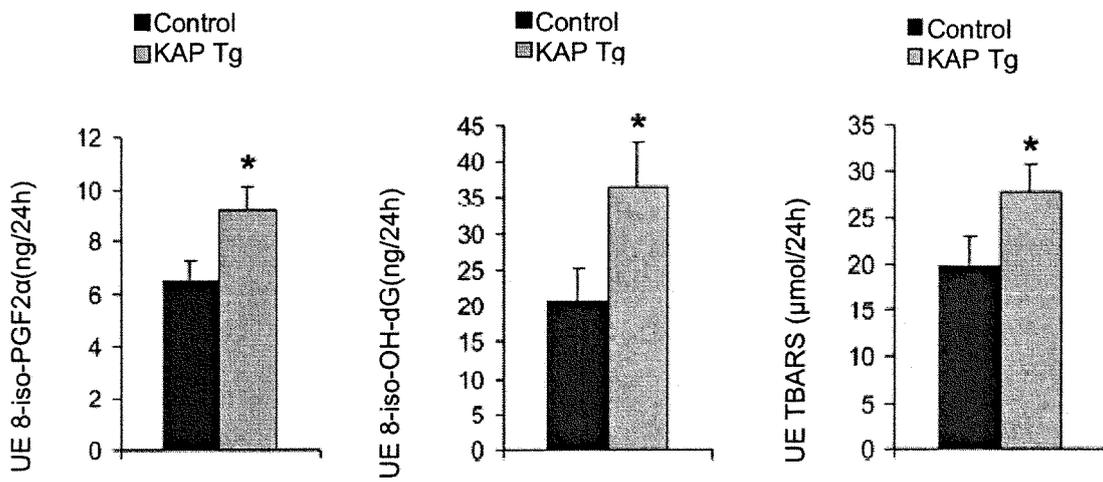


FIG. 6

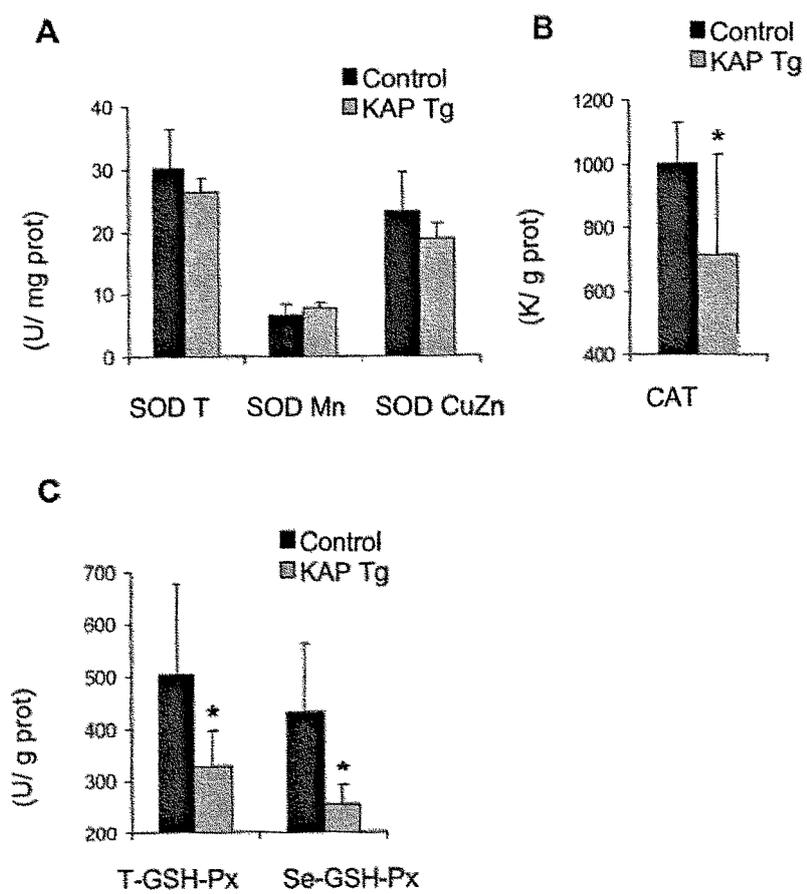


FIG. 7

ES 2 344 289 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> 1) Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron
2) Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biología Molecular -CIBBIM

5

<120> Construcción génica que comprende el gen que codifica la proteína KAP y animal no humano modificado genéticamente con la misma

10 <130> P1252ES00

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10060

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

25 <223> Construcción génica con promotor de la proteína KAP de *Mus musculus* operativamente unido a la secuencia de ADN codificante de la proteína KAP

<400> 1

30

gatataccta gtcgggggtac tggttagtgc ataagtctgt tccacctata gggttgcaga 60

tccttttagc tccttggtta cttctcttag ctctccatt gggagcccta tgatccatcc 120

35

attagctgcc tgtgagcatt tacttctgtg tttgctaggg cccggcatag tctcacaaga 180

gacagctaca tctgggtcct ttcgataaaa tcttgctagt gtaggcaatg gtgctagcct 240

40

ttggatgctg attatggggg ggatccctgg atatggcagt ctctacatgg tccatcttgc 300

atctcagctc caaactttgt ctctgtaact ccttccatgg gtgttttgtt cccaaatcta 360

aggaggggca tagtgtccac acttcagtct tcattcttct tgagtttcat gtgttttagca 420

45

aattatatct tatactcttg gtatcctagg tttgggggcta atatccactt atcagtgagt 480

acatgttctg tgagtttctt tgtgaaatgt ttacctcact caggatgatg ccctccaggt 540

50

ccatccattt ggctaggaat ttcataaatt cattctttttt aatagctgag tagtactcca 600

ttgtgtagat gtaccacatt ttctgtatcc attcctctgt tgaggggcat ctaggttctt 660

tccagcttct ggctattata aataaggctg ctatgaacat agtggagcat gtgtccttct 720

55

taccagttgg ggcattctct ggatatatgc ccaggagagg tattgctgga tcctccggta 780

gtactatgtc caatcttctg aggaaccgcc agactgattt ccagagtggg tgtacaagcc 840

60

tgcaatccca ccaacaatgg aggagtgttc ctctttctcc acatccacgc cagcatctgc 900

tgtcacctga atttttgatc ttagccattc tgactataac ccatgttctt gaccccattg 960

65

tacagagcca gcatccttgg taaatgtgga gttatcaact ctcaaccttc aacctccgcg 1020

tggggaaacg gggcgaaatg gctactgcta ggctactggt gagaatcaca tgggtctggca 1080

ES 2 344 289 A1

	cttctagata gttctgcttt tgcaatgagc agttcttcac tgttctccag caatctgcc	1140
	ggatgaggac tctaatacgt acatgagggt tttccttaga gtaaacacgt ccattttttt	1200
5	tggacacaaa accatctttg ggggtgcagaa aagactagct cttagcctaga ggacaaagaa	1260
	cagcaatggg ggtgatctgg tggagtagat gaccctggc cattagaggg taatggtgct	1320
10	aatggcaatg ggtggtgcac ctatgcagac tttctcctac ccagattct attgtttcta	1380
	tggttcctag ttagtttttc ttaacttctt tctgggtgca ttctttaata gttcataaag	1440
15	gtccttccca aacctctccc cgcccccttt tttttctctt ccagccaact gtggaaaacc	1500
	accttcaggg agaggggtaca ggatgtataa aagcccagga ggactctttt tggactaatt	1560
	tctttctctt gttatgatgc ttttcaaggt cctggtgatc actgtcttct gtggtctgac	1620
20	tgtggctttc ccoctgtcag aattagtttc aatcaataaa gaactacaga attcaatcat	1680
	tgacctacta aactcagtct ttgaccaact gggatcatac agaggggacaa aagctcctct	1740
25	agaggattat acagatgatg atttaagcac tgactctgag cagatcatgg acttcacgcc	1800
	agccgcaaac aaacagaatt ctgagttctc tactgatggt gagacagtct cctccggett	1860
30	tctggaagaa ttcactgaga acacagacat cacagtgaaa attccattag ctgggaatcc	1920
	agtctcccct acttctgac ggccgctgga cagcaccctg gctttcaaca cctacgtcca	1980
	cttccaaggt aaggcaaac tctctgctgg ctctggcctt aggacttagt atccaatgtg	2040
35	tagctgagat cagccagtca ggccttggag atgggcaggg ggcagccctg cggacatacc	2100
	tggtgaccac ccttgagaag tggggaagtg gctgctccgc tgggtccctg gatgggcccgt	2160
40	ccacctctg gacctgctgc cctactatgt gcacgactat acaacatcct ttttcttaca	2220
	tcatttaatc cccttatgat gtgggtgaaga ggtatttgtg cctttgttta ccagtgaaga	2280
45	aatagagact cggagaaaca aagtgccttg ctcaagatgg cacagccacc agtgggggtc	2340
	ctgggattga aacctcacatc tcctggcccc acagcccagt totacactca gaagggtcag	2400
	gttcataatc cttgagaagg tcaggaactg gggctccctg cccatgcaga aataagcaat	2460
50	tggcttgctt aaatcccctt catgttagga ggggcattac tgaaaaccct ctactacaaa	2520
	gattgttgat tttttttttt ttttttattg agacagggtc ttgttctgtc acccaggctg	2580
55	cagtgtagtg gtgccatcat tgctcactgt agccttgaac tctggcctc aagcgcctc	2640
	cccacctctg ccttccaaag tgttgggatt aaaggtgtga gccactgcac ccagccacag	2700
	attgcttaaa gcattcattt aacaaatact tgttgaggat ttgctacttg taagacttta	2760
60	agcctggcat ctacagaggag gccagaggag ggctgtatag gccctgcctc caggctttta	2820
	aaggtcaatg ggcaaatgcc taggatttgg agctgcaggg aaacgtgctc cacaaggtaa	2880
65	ctcaggaag cctcggggct ctacagaggac agaggtcact ggggagcgga gagcaggcct	2940

ES 2 344 289 A1

	tgccctggcag tgagggcaac agggctggtg aagctaggag caagcatgat gagcccagcc	3000
	tgcagagttt ggggcaagga acgaggatgg ggcggttggc ttggcatgag tgttgaacca	3060
5	gaaaatgggc ctggggaggg cagagctgga gacactttga acgccatgct tggtaggtgt	3120
	gggaatgggg acgcgttctg ttcagaggtc atccccgaag cctgccgtgt gcagactgga	3180
10	ggcagggagg attgtttgaa ggttacgcaa gagtccaggc acacagtac ggaacacgt	3240
	gctcagggag cagctcggca aatccatggg tggggtgggg ctgaggggtg tgtctaagag	3300
15	acactgagga ggctctgtca agatgttaac ctcgtgaggg acagagagcc aggcgggagg	3360
	tgaaagacaa gactgtggag aaagaggttc agtggcgcac agtgattttt cttaccacaa	3420
	caacctcctt gaggtctttc ccttcgggtt cagggagagg tgatagatgg ggggattgct	3480
20	cagccctggc actgactggt cacaggggca gaggccagcc cgagggttgc ccggttgagg	3540
	gtggcagcac actgtgcagg gcagagcagg gacacatgga cttagcctgc tgtccctagg	3600
25	agaagtgctg ggaggagcgc tcaactgagaa ggagggctct gcagaaggca aaggcaagaa	3660
	agccagtggc atctgaaatg ggtctccctt cgaaagagag cacatccacc tgaccagac	3720
	cgcagagcca ggccaggagg aagaggagga agaataaaaa agccaaccac atcgggactc	3780
30	aaaggaagcc caggatcctc gccggcctcc accgcatgct gccctgacc tgccccactt	3840
	cctaactttg ctggcctcag tttccgtcaa aggaggcagc cacttctgc ccacatggtc	3900
35	tgtccagtga ggagatcggg ggctgtctcg ggacctctag gtttcccttt agcaatgatg	3960
	ttctatttac atgacctcag caggcagcta gatgtgtccc actagagagg acctgaggat	4020
40	ctggggcctg atgggctcca gggtagcgtc tgcccagtgc ttgctgtgct cctgagcatg	4080
	gggcgctggc cctggtggtt tccatgacac caggctctga cttgacctcg acagatttac	4140
	ctagcctccg gatgagaatg gtgagctgtg catgtcagac gagcagaggg aagacggcag	4200
45	ccactctcat gtcaaatccc agcgtctttt gggaggcagc ttcccttttt tagtttagtt	4260
	tgttgggaaga aaagaattgt ccccttcccc cctctaaact aaaagccttg ccagcccagg	4320
50	tgggcagcac cgaggtccct gcagggaacg tgcaagggga accctgcagt ttcccgtca	4380
	catgcccctc cgagactgag tgctccgagg actgaggacg agaaatatgc caggtctgcc	4440
55	actgccttct tacgagacc gccaccaggg gaggcacagc catgcccagc tcctgcctgc	4500
	cagttctgtc ctcccagctg ccctactttc atgetgggac ctccaattca gtacaaaggg	4560
	agacctcact gtttctgaac catctctact cagactccca agtgccacgt gccagggga	4620
60	ctgttctgtg acaaacttat acacaacttc accctattct cctaagaaca accgcagaat	4680
	aggcctttca ggatgagtgg gaggacagcc gagggcaggg atgtgctagt gtaaggtcga	4740
65	ggcagagggg gggctgctgt catggaaaga cccaggtaa ctgcgtcaca cacaaatttg	4800

ES 2 344 289 A1

	tgtccttctc ccacaacggg ctctcccag tctctgtca tetgcacggc cctgtgagca	4860
	ggaggggaaa cagagggctc acccctgccc ccaaggccca gtgtgcaaat ccattcatca	4920
5	caacgaggtt gtgtgagtct ccccagtagc aagggtgct gaggaatgga gccctcgttt	4980
	ccggggcctg cgtggcccac tctgtattct atgactgtga tgggggaggg tgggggccac	5040
10	aggacagctg gtgggctctg ccatggctgg ggctagacat ggattaaaaa gtgagtatga	5100
	gcaggggcct ctaggagtgg tgggatagtg cggtggtggc cacatgtcat tctacgtgcg	5160
15	tccaaaccta cagaatgtaa aacaccagga gggagactca aagaaaacta tcaactttga	5220
	gtgctgagga cgtgtcagtg taggttcgtc agttgcaaca aatgggccac gctggtgtga	5280
	gatgttgatc acgggggagg ctgtgtagtg ggggacaaga gttatatggg aactttctgt	5340
20	actttctgct cgattttgct gtgaacctaa agtcaactta aaaaataaca tctcttaa	5400
	tttttaaaaa gtgagtgtgt caaacacag cctttgggtc aggacagttc taggtttgag	5460
25	ttgacctggc aggtaccagt ggcttatgtc ccttaagggtg acagatgcaa aacccccggt	5520
	ttggtgcctg gcatgttggt tgtcttgag gtggcggtta gggctgcctc agtgaactca	5580
	aatggctgca ttttacagga gaaatatttg agccacactt gcggtcctgt ggccaggaga	5640
30	atgcagagtg gcctgggggg ggccaaggaa ggaggctgag gcagggcgag gggcaggatc	5700
	tgggcctttg gtgtctgcca gccctcattc ctgcccctgt cttgggtgac tcttccctcc	5760
35	ctgtctcctg tctggatttc agggaagatg aagggttct cctgctggc cgagccccag	5820
	gagttctggg tggacaacag cacctcagtg tctgttccca tgctctctgg catgggcacc	5880
40	ttccagcact ggagtgacat ccaggacaac ttctcgggtga ctcaagtgcc cttcactgag	5940
	agcgctgcc tgetgctgat ccagcctcac tatgcctctg acctggacaa ggtggagggt	6000
	ctcactttcc agcaaaactc cctcaactgg atgaagaaac tatctccccg gtaggagcct	6060
45	cccgtctcc cctggaatgt gggagccaca ctgtcctgcc caggctgggg gcgggggtggg	6120
	gagtagacac acctgagctg agccttgggt gcagagcagg gcagggccgc ggtggcacgg	6180
50	ggctgggcag gcggcctgtg tgtctgtcta ccagtcctct atccagccag caccagctc	6240
	tccagttagt gtctgtcttt caagtgcagg caaggtaaag gaggagagga agaattgcttt	6300
55	ttctacactt acacttgccct ggtagttttg gagggggaga aaacattgca atccgcctc	6360
	tgagagagga ccattttggt cccacacctg acacacagca cacctgtgac atccaagagc	6420
	ttcttggaac tgacttgcca ggagggttcg gacttcgcgt gagcgggggt ggggccttct	6480
60	cagggagcgt cccttgacte cagaacgccc ttgctggcgg ctggcggtct ggtggggata	6540
	ggtgttgta gctcctcttt cctgctgcaa ttcctttcca cagagcctg gactcaaact	6600
65	acacatcacc ccagatcacc gaggcctgga aatctgctcc cagaggcagg cattgagtga	6660

ES 2 344 289 A1

	cacgatggct tgacatcaac tctgggtggt ttttatgttt taaaaattgt gatggtaaaa	6720
	tatacgtaac aaaatttgcc atcgtaacca ttttcgagtg cacagttcag tggactagg	6780
5	cccattcaca ctgttgtgca gccatcaccc cegtccatct ccatttatct tctcaacttc	6840
	ccaaactgaa gctctgtcct gctgaaacac taactctcca tttccccttc cccttggccc	6900
10	cggcaaccac cacgatgtcc tegaggttca cccatgttgt agcacatgtc agaatgtcct	6960
	tccttttgaa ggctgaataa tattccattg catgtggtta ccaccttttg tgtatccact	7020
15	catccatcga tggacacgtg ggttgcttcc acctttgagc tgctgtgaat agtgcagtgt	7080
	accctgtaaa catgggtgta ctgtcagctc ttataagtgc ttgatacatc actggaaatg	7140
	tccatgggct ctgaaggatg ccaaaagatg gaagaggctc tatacgaaga tcaatcgagt	7200
20	tgacatagca acgtgtccag cacgaggttg aactgtacc ctctgcctc tctccttttc	7260
	atgggtgtca tgtcatcaag aacctgtgtg tggcagtagt aagacacagt gcattatttc	7320
25	agagaatagc atttaaaaat tacccaagta acacaccttc aatgcagcca acctaaaaac	7380
	agaatgcacc aaaggacaac cattcctagg tctcatcgg taaatcttct atgtccctca	7440
	catagtattg caaatgacat gaaggatfff tattgtaggt tttgctgaaa ttttcccaa	7500
30	gggggaggat gacttagttg ggtgatgggg ggagcaaaca tcctgtcgt cagggttggg	7560
	tgcaaggagc ataagcctgc ctggcctctg ggagagcct cactgtgtgg cctggagcct	7620
35	tcctaactgt gcatcatctc cccaggacca tccacctgac catgccccaa ctggtgctgc	7680
	aaggatctta tgacctgag gacctgctog cccaggctga gctgcccgcc attctgcaca	7740
40	ccgagctgaa cctgcaaaaa ttgagcaatg accgcatcag ggtgggggag gtatgtgtga	7800
	gcctgtgtct gtgcctgacc tgggttccaa gtgtgcacag ggtgggaggc atggatgtaa	7860
	gggacacaga ggaggctatg ggtggggcca gcagggcaag agggagcgga gagtagggcc	7920
45	aaaggtggga gagaagtagc cagagcattc tggggccttc caggtgcaga gcagcaaatc	7980
	cctccccatc cctgctgtgc ctctcctgc taggtgtgtg ttccatggtc ctgcttggcc	8040
50	ttgccttgcc tcagggtcct ccagggttcc tatagtggag ttgaaaccgg gatgaagaca	8100
	gcaagcacc cctggacctg tgccctgggc ccagcccctt cttcagggaa atgctgagca	8160
55	gcagacagaa tgtccccctg ccatgtggca ccatgcacat ctgcagctac caaggatgtg	8220
	ccttgatggt ctgggcctg tgctcagtgc tggggagaaa gtgggagttc ttacgggggc	8280
	cagcgggaag agccctctgt gctaagttag ctaagcctg gactgtgtgg gccatggcca	8340
60	agggagccag gaattctgcc tgggacatca gggcagaatg tgaagatggg aggatgtaag	8400
	gggtgtgtta gggaggagcc ggcattgtgag tttggccatt gtggccaatt aacggctatc	8460
65	tacacacaga cacacccttg cctacactga ggggcaggca tacactgtgc atcctcctgg	8520

ES 2 344 289 A1

	caggctggaa aatgtccccc tccaggacag tgcacagcac agaggtcctg agcccacccc	8580
	ggccctctag ccctcagcac cctgggtcac ccagtgcgcc ctcagaatga tcctgatgtc	8640
5	tgctgctttg cagggtgctga acagcatttt ttttgagctt gaagcggatg agagagagcc	8700
	cacagagtct acccaacagc ttaacaagcc tgaggtcttg gaggtgaccc tgaaccgccc	8760
10	attcctgttt gctgtgtatg atcaaagcgc cactgccctg cacttctctg gccgcgtggc	8820
	caaccgcctg agcacagcat gaggccaggg cccagaaca cagtgcctgg caaggcctct	8880
15	gccctggcc tttgaggcaa aggccagcag cagataacaa ccccggacaa atcagcgtatg	8940
	tgtaaccccc agtctcccaac cttttcttct aatgagtcga ctttgagctg gaaagcagcc	9000
	gtttctcctt ggtctaagtg tgctgcatgg agtgagcagt agaagcctgc agcggcacia	9060
20	atgcacctcc cagtttgctg ggtttatfff agagaatggg ggtggggagg caagaaccag	9120
	tgtttagcgc gggactactg ttccaaaaag aattccaacc gaccagcttg tttgtgaaac	9180
25	aaaaaagtgt tcccttttca agttgagaac aaaaattggg ttttaaaatt aaagtataca	9240
	tttttgcaat gccttcgggtt tgtatfftagt gtcttgaatg taagaacatg acctccgtgt	9300
	agtgtctgta ataccttagt tttttccaca gatgcttctg atttttgaa aatacgtgaa	9360
30	agatgcaagc acctgaatff ctgfffgaat gcggaaccat agctggffat ttctcccttg	9420
	tgfftagaat aaacgtcttg ccacaataag cctccaaaaa ttttatctff catttagcag	9480
35	ccaaacagat gtatacaatt cagcagatag actgtgcaaa cgaaagtgtt ttctggact	9540
	ttggatggaa tttccatggg aggtctgagc cagtacttag cagtctfftg aagttfftagg	9600
40	tgatgctfff ctctggacac ttccattggg aagcagtggg ggccatctgt gtgatggaca	9660
	gggggcggga agaggggtgac agggaaaggcc ccatacccca tgtggcacct gggaaaggaa	9720
	ccaggcagat gggacttctt ccgtctctggg gacacagggc cagactgctg ctggattgt	9780
45	gccccgggag tggaaggtag agaaataaat cttcacaat aaatatttgc aattttcccc	9840
	catctgttga gtgcctctgc ctgctctctc tcgatgggat taggcccaca gttcggaatc	9900
50	ttggggagag ccaaggaagc ggtaggcacc cagtaggccc acggccgtcg gctgatagca	9960
	atggtgatgc tgcctacct acttgtgtaa ggcattcgat cttctctcct tccatacata	10020
55	ttgaaataaa taagccgcgc aatgtgttag ctatcatatg	10060

<210> 2

<211> 1544

60 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

65 <223> Secuencia promotor modificado proteína KAP de *Mus musculus*

ES 2 344 289 A1

<400> 2

	gagctcgggg tactggttag ttcataatgt tgttccacct atagggttgc agatcccttt	60
5	agctccttgg ctactttctc tagctcctcc attgggagcc ctatgatcca tccattagct	120
	gcctgtgagc atctacttct gtgtttgcta ggccccggca tagtctcaca agagacagct	180
10	acatctgggt cctttcgata aaatcttgct agtgtatgca atggtgctag cctttggatg	240
	ctgattatgg ggtggatccc tggatatggc agtctctaca tgggccatct tgcactcag	300
15	ctccaaactt tgtctctgta actcttcatg ggtgttttgt tcccaaactc aaggaggggc	360
	atagtgtcca cacttcagtc ttcatctctc ttgagtttca tgtgttttagc aaattatatac	420
	ttatatcttg ggtatcctag gtttggggct aatatccact tatcagtgag tacatgttgt	480
20	gtgagtttct ttgtgaatgt gttacctcac tcaggatgat gccctccagg tccatccatt	540
	tggctaggaa tttcataaat tcattctttt taatagctga gtagtactcc attgtgtaga	600
25	tgtaccacat tttctgtatc cattcctctg ttgaggggca tctaggttct ttccagcttc	660
	tggctattat aaataaggct gctatgaaca tagtgaggca tgtgtccttc ttaccagttg	720
	gggcatcttc tggatatatg cccaggagag gtattgctgg atcctccggt agtactatgt	780
30	ccaattttct gaggaaccgc cagactgatt tccagagtgg ttgtacaagc ctgcaatccc	840
	accaacaatg caggagtgtt cctctttctc cacatccacg ccagcatctg ctgtcacctg	900
35	aatttttgat cttagccatt ctgactataa cccatgttct tgacccatt gtacagagcc	960
	agcatccttg gtaaagtgtg agttatcaac tctcaacctt caacctcccg ctggggaaac	1020
40	ggggcgaaat ggctactgct aggctactgt tgagaatcac atggctctggc acttcaagat	1080
	agttctgctt ttgcaatgag cagttcttca ctgttctcca gcaatctgcc aggatgagga	1140
	ctctaattgcg tacatgaggt ttttccttag agtaaaacag tccatttttt ttggacacaa	1200
45	aaccatcttt ggggtgcaga aaagactagc tctagcctag aggacaaaga acagcaatgg	1260
	gggtgatctg gtggagtaca tgaccctggt ccattagagg gtaatggtgc taatggcaat	1320
50	gggtggtgca cctagtcaga cttctctcta cccagattc tattgtttct atggttccta	1380
	gttagttttt cttacttcc ttctgggtgc attctttaat agttcataaa ggtccttccc	1440
55	aaaccctcc ccgccccctt tttttctctc tccagccaac tgtggaaaac caccttcagg	1500
	gagagggtag aggatgtata aaagcccagg aggactcttt ttgg	1544

<210> 3

60 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

65

<220>

<223> Cebador PCR directo

ES 2 344 289 A1

<400> 3

ttgccttaac cctactaaag c

21

5 <210> 4

<211> 18

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR reverso

15 <400> 4

ggaagtaggg gagactgg

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 289

② Nº de solicitud: 200900217

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NIU, E. et al. "genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene". DNA AND CELL BIOLOGY. 1991. Vol. 10, N°. 1, páginas 41-48; todo el documento, especialmente figuras 2 y 4.	1-3,5,6
Y		4,7-12
Y	DING, Y. et al. "The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 31.10.1997. Vol. 272, N°. 44, páginas 28142-28148; Resultados.	1-8
Y	LAVOIE, J.L. et al. "Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule". AM J PHYSIOL RENAL PHYSIOL. Mayo 2004. Vol. 286, páginas 965-F971; Resultados.	1-8
Y	WO 0235923 A1 (DUKE UNIVERSITY) 10.05.2002, reivindicaciones.	7-12
Y	US 2002095691 A1 (RUIZ-OPAZO) 18.07.2002, reivindicaciones.	7-12

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

30.04.2010

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/12 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

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

C12N, A01K, G01N

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

INVENES, EPODOC, EBI, BIOSIS, WPI, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4, 7-12	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, 5, 6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-12	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.

Consideraciones:

La invención consiste en una construcción génica de secuencia SEQ ID nº 1, que comprende el gen de la proteína renal regulada por andrógenos (KAP) de ratón, bajo el control del promotor de la propia proteína KAP de secuencia SEQ ID nº 2; la construcción incluye secuencias del gen del angiotensinógeno humano que actúan como potenciadoras de la expresión. La invención reivindica también el ratón transgénico que incorpora la construcción génica y un método de selección de compuestos candidatos para tratar la hipertensión utilizando dicho ratón transgénico.

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	NIU, E. et al. "genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene". DNA AND CELL BIOLOGY . 1991. Vol. 10, N°. 1, páginas 41-48.	1991
D02	DING, Y. et al. "The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 31.10.1997. Vol. 272, N°. 44, páginas 28142-28148.	31-10-1997
D03	LAVOIE, J.L. et al. "Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule". AM J PHYSIOL RENAL PHYSIOL. Mayo 2004. Vol. 286, páginas 965-F971.	01-05-2004
D04	WO 0235923 A1 (DUKE UNIVERSITY)	10-05-2002
D05	US 2002095691 A1 (RUIZ-OPAZO)	18-07-2002

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, describe la organización genética de la secuencia de ADN que codifica la proteína KAP de ratón. La Fig. 4, describe la secuencia del promotor de la proteína KAP.

El documento D02, describe la construcción de un ratón transgénico que incluye una construcción de angiotensinógeno humano bajo el control del promotor KAP. Dicha construcción se expresa en las células PCT (túbulo contorneado proximal) del riñón y el modelo permite examinar la expresión específica en riñón de angiotensinógeno y su relación con la regulación de la presión arterial.

El documento D03, describe la construcción génica en la que se basa la construcción de la presente solicitud. Fue construida con el promotor de la proteína KAP, un punto NotI donde se inserta el gen hREN de la renina humana y elementos amplificadores que se encuentran en los exones 3-5 del angiotensinógeno humano hAGT.

Los documentos D04 y D05, presentan animales transgénicos que incluyen genes relacionados con la hipertensión, diseñados para el estudio y rastreo de nuevos fármacos antihipertensivos.

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

NOVEDAD

Las reivindicaciones 1-3, 5 y 6, en la forma en que están redactadas, se encuentran incluidas en el objeto descrito en el documento D01. El documento presenta la secuencia del gen KAP y la secuencia de su promotor (SEQ ID n° 2, reivindicación 3) en la Fig. 4; por tanto las reivindicaciones 1-3, 5 y 6 carecen de novedad e incumplen los requisitos del Art. 6 de la LP.

La construcción de la reivindicación 4 es nueva y los ratones transgénicos hipertensos portadores de dicha construcción también lo son. Las reivindicaciones 4, 7-12 cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la LP.

Hoja adicional

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-8.

La construcción genética de la invención se basa en la descrita en el documento D03 con la que se consigue expresar renina humana inducible por andrógenos (bajo el control del promotor KAP), en los tubos proximales de riñón de un ratón transgénico. Si se comparan la Fig. 1 de la presente solicitud y la Fig. 1 del documento D03, se comprueba que solamente difieren en que en la construcción de la solicitud, se ha sustituido el gen hREN por el gen mKAP. Teniendo en cuenta esta similitud, no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia, estudiar el comportamiento de la proteína KAP en un ratón transgénico, portador de una construcción genética en la que los elementos reguladores y la estructura (salvo el gen mKAP) son idénticos a los descritos en el documento D03. Por consiguiente, las reivindicaciones 1-8 carecen de actividad inventiva e incumplen los requisitos del Art. 8 de la LP.

Reivindicaciones 9-12.

La utilización de ratones transgénicos en la búsqueda de fármacos activos frente a patologías relacionadas con la expresión de genes de los que son portadores, está descrita abundantemente en el estado de la técnica. Los documentos D04 y D05, describen métodos para identificar compuestos antihipertensivos utilizando ratones transgénicos portadores de los genes GRK2 y ATPasa Na/K alfa1, que codifican productos relacionados directamente con la hipertensión.

El método para identificar fármacos para tratar la hipertensión de la presente invención, no supone un esfuerzo inventivo respecto a los métodos de identificación descritos en los documentos D04 y D05; por tanto las reivindicaciones 9-12, carecen de actividad inventiva y no cumplen los requisitos del Art. 8 de la LP.