



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 310**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05722229 .1**

96 Fecha de presentación : **17.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1729569**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **22.03.2004 SE 0400707**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB.**
Box 30015
104 25 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Nilsson, Lars;**
Lannfelt, Lars y
Gellerfors, Pär

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 310 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer y a los trastornos neurológicos relacionados. La presente invención se refiere también a un procedimiento para producir dicho ratón transgénico, y a los procedimientos de cribado de agentes terapéuticos o diagnósticos útiles en el tratamiento o el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo progresivo e irreversible que produce discapacidades cognitivas, de memoria y de comportamiento. Es la causa más habitual de demencia entre los ancianos afectando aproximadamente al 5% de la población por encima de los 65 años y al 20% por encima de los 80 años de edad. La EA se caracteriza por un comienzo insidioso y un deterioro progresivo en múltiples funciones cognitivas. La neuropatología implica depósitos proteínicos argirofílicos extracelulares e intracelulares. Los depósitos extracelulares, denominados placas neuríticas, están constituidos principalmente por péptidos de beta amiloide (A β) rodeados por neuritas distróficas (procesos neuronales hinchados, distorsionados). Los péptidos A β contenidos en estos depósitos extracelulares son fibrilares en su carácter con una estructura en lámina β plegada. Se puede teñir el A β en estos depósitos con algunos colorantes, por ejemplo, Rojo Congo y muestra una ultraestructura fibrilar: Estas características, adoptadas por los péptidos A β en su estructura fibrilar de placas neuríticas son la base del término genérico amiloide. Frecuentes placas neuríticas y depósitos de ovillos neurofibrilares en el cerebro son criterios diagnósticos de la EA, que se realizan cuando el paciente ha muerto. Los cerebros EA muestran también atrofia macroscópica del cerebro, pérdida de células nerviosas, inflamación local (microgliosis y astrocitosis) y a menudo, angiopatía amiloide congófica (AAC) en las paredes de los vasos cerebrales.

25 Dos formas de péptidos A β , A β 40 y A β 42, son las especies dominantes en las placas neuríticas de EA (Masters y col., 1985), aunque A β 40 es la especie destacada en el amiloide cerebrovascular asociada con la EA (Glennner y Wong, 1984). Las actividades enzimáticas permiten que se formen continuamente estas A β a partir de una proteína más grande denominada la proteína precursora amiloide (AAP) en sujetos sanos y que padecen EA en todas las células del cuerpo. Dos episodios principales de procesamiento de AAP (las actividades β y γ -secretasa, permiten la producción de péptido A β mediante escisión enzimática, mientras que una tercera actividad, denominada α -secretasa, evita el péptido A β mediante la escisión en el interior de la secuencia del péptido A β (revisado en Selkoe, 1994; documento US5604102). El A β 42 es un péptido que tiene una longitud de cuarenta y dos aminoácidos, es decir, dos aminoácidos más largo en el extremo C, en comparación con A β 40. El péptido A β 42 es más hidrófobo, y se agrega más fácilmente en estructuras más grandes de péptidos A β , tales como dímeros A β , tetrámeros A β , oligómeros A β , protofibrillas A β o fibrillas A β son hidrófobas e insolubles, mientras que las otras estructuras son todas menos hidrófobas y solubles. Todas estas estructuras moleculares mayores de péptidos A β se definen individualmente basándose en su apariencia biofísica y estructural, por ejemplo, en el microscopio electrónico, y sus características bioquímicas, por ejemplo mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño/transferencia western. Estos péptidos A β , particularmente A β 42 se ensamblarán gradualmente en diversas estructuras moleculares mayores de A β durante toda la vida. La EA, que es un trastorno fuertemente dependiente de la edad, se producirá antes en el transcurso de la vida si su proceso de ensamblaje se produce más rápidamente en el cerebro del individuo. Esto es el punto central de la "hipótesis de la cascada amiloide" de la EA, que requiere el procesamiento de APP, los niveles de A β 42 y su ensamblaje en estructuras moleculares mayores son la causa central de toda la patogénesis de la EA. Todas las diferentes neuropatologías de la EA cerebral y los síntomas de la EA tales como la demencia son, de alguna manera, producidos por los péptidos A β o sus formas de ensamblaje. La evidencia principal de la "hipótesis de la cascada amiloide" procede de los estudios genéticos de individuos de familias que padecen un comienzo temprano de la EA familiar como rasgo dominante. Estos estudios han desvelado que mutaciones raras en el gen de la AAP son suficientes para generar formas graves de EA. Las mutaciones se agrupan en y alrededor de Val 717 ligeramente en la dirección 3' del extremo C de A β 1-42 (Goate y col., 1991, Chartier-Harlan, y col., 1991, Murrell, y col., 1991) y una única mutación doble (670-671) inmediatamente en la dirección 5' del extremo N de A β en una familia Swedish (Mullan, y col., 1992; US5795963). Las mutaciones de AAP, que enmarcan la secuencia del péptido A β (la mutación "Swedish"; Citron, y col., 1992, Cai y col., 1993), o que aumentan la relación de producción de A β 42/A β 40 y que generan también péptidos A β que se extienden en el extremo C para incorporar la mutación patogénica en el péptido A β , por ejemplo, A β 50 (las mutaciones "717" están en la posición 46; Suzuki y col., 1994; Roher y co., 2003). De esta manera, las mutaciones "717", además de A β 40 natural y A β 42 natural, generan también los péptidos London A β (V717I) y los péptidos A β Indiana (V717F, A β 46 y formas más largas de A β) que forman rápidamente fibrilla A β . En contraste, la mutación Sueca genera únicamente

niveles crecientes de péptidos A β 40 y A β 42 naturales. El comienzo temprano de la EA familiar se produce más a menudo por mutaciones en presenilina 1 (en el cromosoma 14; documentos US5986054; US5840540; US5449604) y en algunas casos por mutaciones en presenilina 2 (cromosoma 1). La presenilina 1 y la presenilina 2 son proteínas transmembrana politópicas que, junto las otras tres proteínas nicastrina, aph1 y pen-2, constituyen el núcleo funcional necesario del complejo de la γ -secretasa que permite la formación del péptido A β mediante la escisión enzimática de AAP (Edbauer y col., 2003). Todas las mutaciones patógenas de la EA en proteínas presenilina 1 y presenilina 2 aumentan significativamente la producción en exceso de A β 1-42 (Schuener y col., 1996). La apolipoproteína E (ApoE) es, además de la edad, el factor de riesgo más importante para el comienzo tardío de la EA. Existen tres variantes de la proteína ApoE en seres humanos, debido a una única sustitución de aminoácidos en la proteína ApoE. La variante ApoE4 confiere un creciente riesgo de EA, mientras que la variante ApoE2 es protectora en comparación con la variante ApoE3 predominante (Strittmatter y col., 1993; Corder y col., 1993). Estos cambios de proteínas no son determinísticos, pero confieren una susceptibilidad creciente o decreciente a desarrollar la EA en una población. La capacidad de las variantes de ApoE de facilitar la deposición amiloide en modelos APP de ratones transgénicos de EA es mayor para ApoE4, intermedia para ApoE3 y menor para ApoE2, sugiriendo que el mecanismo patógeno de la EA es para potenciar el ensamblaje del péptido A β y/o la deposición amiloide (Fagan y col., 2002). Otras proteínas tales como α_1 -antiquimotripsina (Nilsson y col., 2001) y ApoJ/clusterina (DeMattos y col., 2002), potencian también el ensamblaje del péptido A β y/o la deposición amiloide en ratones APP transgénicos, de manera similar a ApoE. Neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de la insulina (IDE) degradan los péptidos A β y están implicadas probablemente en la EA. Sin embargo, ningún genetista humano ha probado que estas proteínas estén implicadas en la EA. Una característica esencial es comprender mejor como el aumento de los niveles de A β o de sus agregados producen demencia y pérdida funcional en pacientes con EA. Se ha creído desde hace mucho tiempo que las fibrillas amiloides insolubles, el principal componente de la placa neurítica, son las especies patógenas en el cerebro con EA. Se ha demostrado que elevadas concentraciones de fibrillas A β son citotóxicas en modelos de cultivo celular de células nerviosas en el cerebro (Pike y col., 1991; Lorenzo y Yankner y col., 1994). Sin embargo la hipótesis de la fibrilla amiloide como la principal especie neurotóxica es inconsistente con la mala correlación entre la densidad de la placa neurítica y el marco de la demencia por EA y también con pequeños signos de neurodegeneración en ratones APP transgénicos actuales. Se podrían hacer desaparecer la unión las especies neurotóxicas solubles de intermedios de A β y sus sitios subcelulares de formación y distribución lo que explicaría mejor la hipótesis amiloide. Esta idea ha ganado apoyo a partir del reciente descubrimiento de la mutación Arctic (E693) de APP, que produce el comienzo temprano de la EA (documento W00203911; Nilsberth y col., 2001). La mutación se localiza en el interior de la secuencia del péptido A β . Los portadores de la mutación generarán por tanto variantes de péptidos A β , por ejemplo Arctic A β 40 u Arctic A β 42. Arctic A β 40 y Arctic A β 42 se ensamblarán mucho más fácilmente en estructuras moleculares mayores de péptidos A β que sean solubles y no fibrilares en su estructura, particularmente, protofibrillas A β denominadas LSAP (Protofibrillas amiloides solubles grandes). De esta manera, el mecanismo patógeno de la mutación Arctic difiere del de otras APP, las mutaciones PS1 y PS2 y sugiere que las estructuras moleculares mayores solubles de los péptidos A β , por ejemplo, las protofibrillas A β son la causa de la EA. Se ha demostrado recientemente que los péptidos A β oligoméricos solubles deterioran el potenciamiento a largo plazo (LTP), una medida de la plasticidad sináptica que se piensa que refleja la formación de la memoria en el hipocampo (Walsh y col., 2001). Además, estos péptidos A β Arctic oligoméricos muestran un efecto inhibitorio mucho más profundo que los A β naturales en el LTP en el cerebro, debido probablemente a su fuerte propensión a formar protofibrillas A β (Klyubin y col., 2003).

Es muy necesario un modelo animal de la EA con las características de la enfermedad humana para mejorar la comprensión de la patogénesis de la EA ya para evaluar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos. El modelo animal ideal de EA generaría la neuropatología completa de la EA y el fenotipo clínico, por ejemplo las disfunciones progresivas cognitivas y en la memoria. Se ha llevado a cabo un progreso importante en esta dirección usando la expresión transgénica en exceso de las mutaciones patógenas de la EA que albergan APP. Los modelos de APP transgénicos actuales de la EA muestran importantes características de la patogénesis de EA tales como la formación regioespecífica y dependiente de la edad de las placas difusa y neurítica en el cerebro. La patología amiloide está asociada con tau hiperfosforilada, inflamación local (microgliosis y astrocitosis) y en una extensión variable con angiopatía amiloide congófilica (AAC). Estos modelos se han generado mediante una expresión muy elevada del transgén de la APP humana, particularmente en las células nerviosas del cerebro. Los transgenes transportan siempre una mutación patógena de la EA. De esta manera, se han usado una mutación "717" de APP (V717F; Games y col. 1995; documentos US2002104104; US5720936; US581 1633), o la mutación "Swedish" (KM670/671NL; Hsiao y col., 1996; Sturchler-Pierrat y col., 1997; documentos WO 09803644; US2002049988; US6245964; US5850003; US5877399; US5777194). Ratones doblemente transgénicos que contienen transgenes de APP mutante y de pesenilina-1 mutante desarrollan una formación acelerada de placas amiloides, pero los animales muestran aun un pequeño deterioro mental y no consiguen aún mostrar NFT, células nerviosas y atrofia cerebral (Holcomb y col., 1998; documentos US5898094; US2003131364). Además, los modelos de APP transgénicos actuales tienen probablemente bajos niveles de intermedios solubles en el proceso de fibrilación de A β tal como la protofibrillas A β , lo que puede ser de gran importancia para la patogénesis de la EA. Se han combinado

previamente algunas de las mutaciones patógenas de la EA en un único transgén por ejemplo, se han usado la mutación "Swedish" (KM670/671NL) y la mutación "717" de APP (Indiana, V717F) para potenciar y aumentar la formación de péptidos A β fibrilares y la formación de placa neurítica (Janus y col., 2001). De manera similar, se han combinado y usado la mutación "Swedish" (KM670/671NL), la mutación "Arctic" (E693G) y una mutación "717" de APP (Londres, V717I) en un intento de generar una formación más temprana y aumentada de placa (Teppner y col., 2003), de manera similar a las de los modelos de APP transgénicos Swedish + Indiana (Janus y col., 2001), debido a que los péptidos London A β facilitarán fuertemente la formación de fibrilla A β (Teppner y col., 2003; Roher y col., 2003). Se han demostrado las características únicas de Arctic A β 40 y Arctic A42 de formar una abundancia de protofibrillas estables (Nilsberth y col., 2001; Lashuel y col., 2003). La marcada diferencia en la patología de cerebro humano con EA entre portadores de la mutación London APP (Lantos y col., 1992; Cairns y col., 1993) y la mutación Arctic APP, refuerza la distinción en las características químicas de los péptidos London A β y los péptidos Arctic A β para la neuropatología.

Se encuentra que las siguientes referencias son actualmente las más relevantes:

Stenh C. y col., dan a conocer en "Metabolic consequences of the arctic (E693G) APP alzheimer mutation", Society for Neuroscience. Abstract Viewer and Itinerary Planner 2002, 32ª Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencia, noviembre 02-07 de 2002, Resumen N° 296.6 y en Neuroreport 13, 1857-60 (2002) una línea celular tumorigénica transfectada que alberga ADNc de APP con las mutaciones "Swedish" (KM670/671NL) y "Arctic" (E693G).

Hsiao y col., Science 274, 99-102 (1996) dan a conocer un ratón transgénico que alberga solo la mutación "Swedish" (KM670/671NL).

Mullan y col., Nature Genet. 1, 345-347 (1992) dan a conocer la herencia dominante de la mutación "Swedish" (KM670/671NL) en una familia con enfermedad de Alzheimer.

Nilsberth y col., Nat Neurosci. 4, 887-893 (2001) dan a conocer la herencia dominante de la mutación "Arctic" (E693G) en una familia con enfermedad de Alzheimer.

Teppner y col., 6ª Conf. Internat. AD/PD, Sevilla, España, comité nº 52 (2003), dan a conocer un intento preliminar de generar un ratón transgénico que alberga las mutaciones "Swedish" (KM670/671NL), "Arctic" (E693G) y "London" (V717I). No se describe la patología.

Roher y col., J Biol Chem. 279(7): 5829-36 (2004), dan a conocer que los péptidos A β se extienden más allá del aminoácido 42, por ejemplo. A β 1-46 y A β 1-50, en el tejido del cerebro con Alzheimer de un paciente que alberga una mutación de tipo "London" (V717F).

Kang y col., Nature 325, 733-6 (1987) describe la clonación del ADNc de APP695 humana.

Resumen de la invención

A la vista de las limitaciones de los modelos de la técnica anterior, el objeto de la invención es proporcionar un modelo de ratón transgénico que muestre fenotipos más tempranos de la patología de la enfermedad de Alzheimer (EA) que se puedan cuantificar. Esto podría permitir un cribado más rápido y económico de agentes farmacológicos en la industria farmacéutica y biotecnológica.

Se da a conocer un modelo de ratón de la EA y de los trastornos neurológicos relacionados que tienen patologías de producción de péptidos A β -40 y/o A β -42 Arctic y protofibrillas A β Arctic potenciados y una patología temprana impulsora de péptidos A β Arctic protofibrilares y oligoméricos solubles, que incluye la agregación de A β en el interior de las neuronas del cerebro.

La tinción intraneuronal inmunopositiva de A β (punteada y fuerte) fue resistente al pretratamiento con ácido fórmico concentrado, que es una característica típica del amiloide, es decir, de agregados A β con una estructura de lámina β (protofibrillas), y que se localizó en la capa de células piramidales de CA1 en el hipocampo y en neuronas dispersas de la lámina inferior en la corteza cerebral así como otras neuronas en el cerebro.

Se da a conocer un ratón transgénico con EA, que presenta agregación de A β intracelular temprana y aumentada, que se puede medir de manera precisa. Esta agregación de A β intracelular se produce antes de y aumenta gradualmente en una cantidad antes del comienzo de la formación de la placa extracelular. La agregación de A β intraneuronal soluble temprana y potenciada es un fenotipo patológico de la EA que va más allá de los modelos APP de ratones transgénicos descritos anteriormente. Este fenotipo de la EA está presente en el modelo de ratón de acuerdo con la presente invención mucho antes que en cualquier marcador de la EA que se encuentre en modelos animales anteriores.

5 Se da a conocer también un medio para la identificación de agentes que interfieren, retrasan o inhiben el proceso de la enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana Dichos agentes serían de significativa importancia clínica para el tratamiento de la etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer o la prevención de su manifestación. La provisión del modelo de ratón de acuerdo con la presente invención puede acortar mucho el tiempo necesario para el cribado de dichos agentes.

10 De esta manera, la medida de la extensión de la agregación de A β intracelular permite predecir también la posterior deposición de A β extracelular por adelantado. Se puede realizar esta predicción tan pronto como en 1-2 meses del desarrollo de la neuropatología de la EA. Con las técnicas de la técnica anterior, es posible solo después de 15 meses La presente invención puede usarse de esta manera para cribar más rápida y económicamente los capaces que son capaces de evitar, inhibir e invertir la neuropatología de la EA e una etapa más temprana.

El modelo de ratón transgénico proporcionado por la invención muestra también una reducción en el peso del cerebro, lo que sugiere cambios atróficos en el cerebro tal como los observados normalmente en un cerebro humano que padecía la patogénesis de la EA.

15 El ratón transgénico expresa un transgén que comprende una secuencia de ADN que codifica una Proteína Precursora Amiloide (APP) heteróloga que comprende la mutación Arctic (E693G) y una mutación patogénica adicional de la EA (Enfermedad de Alzheimer) seleccionada entre el grupo constituido por KM670/671DF, KM670/671DY, KM670/671EF, KM670/671EY, KM670/671NL, KM670/671NY, KM670/671NF, KM670/671KL, KM670/671DL y KM670/671EL, y sin mutaciones adicionales de APP, en el que dicho transgén se une de manera operable con un promotor eficaz para la expresión de dicho gen en el tejido cerebral de dicho ratón lo que da como resultado cantidades crecientes de agregados de A β solubles intracelulares, que incluyen péptido A β .

20 De acuerdo con otra forma de realización, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención puede comprender además una construcción directora integrada de manera homóloga para al menos uno de los genes de la enzima nepriliasina o degradadora de la insulina (IDE), que perturba estos genes mediante la ablación del gen (inactivación) y aumenta la producción de del péptido A β -40 y/o A β -42 Arctic.

25 De acuerdo con una forma de realización actualmente preferida, el animal transgénico es un ratón que alberga un transgén que codifica una proteína precursora amiloide (APP) constituida por la mutación Arctic (E693G) y la mutación Swedish KM670/671NL) y sin mutaciones adicionales de APP.

El modelo de la EA de ratón transgénico se define en la reivindicación 1.

30 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para preparar dicho ratón transgénico. El procedimiento de producción de dicho ratón transgénico se define en la reivindicación 7.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de cribado, en el que el ratón transgénico se usa para cribar los agentes útiles para tratar, evitar o inhibir la enfermedad de Alzheimer. Se define dicho procedimiento en la reivindicación 11.

35 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento de cribado, en el que el ratón transgénico se usa para cribar agentes diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer Se define dicho procedimiento en la reivindicación 12.

La presente invención proporciona un modelo de ratón de la EA y trastornos neurológicos relacionados que tienen patologías de formación de protofibrillas A β y agregación intraneuronal de péptidos A β potenciadas.

40 Los ratones transgénicos y su progenie, que producen normalmente péptidos Arctic A β en el tejido cerebral, se pueden usar como modelo de una variedad de enfermedades y para el cribado de fármacos, ensayo de diversos compuestos, evaluación de marcadores diagnósticos así como otras aplicaciones.

Descripción de los dibujos

45 **Fig. 1:** Gel de ADN teñido con bromuro de etidio que muestra la presencia de una señal positiva de la PCR en fragmentos de ADN que tienen una longitud de 428 pb con la pareja de cebadores en la dirección 5' (**A**) y 441 pb con la pareja de cebadores en la dirección 3' (**B**) Se ha analizado el ADN genómico de diferentes fundadores y se han asignado a fundadores Thy-SwedishArcticAPP positivos para la PCR los números de línea A, B, C, y D, tal como denotan anteriormente los geles Los patrones del peso molecular del ADN ("mw-std") muestran las longitudes de diversos fragmentos de ADN predefinidos. Las dos parejas de cebadores enmarcan la región completa del transgén APP y del promotor basal del promotor Thy-1.

50 **Fig. 2:** Imagen del formador de imágenes de fósforo de una transferencia en hendidura que refleja la emisión

radioactiva de muestras de ADN genómico hibridadas con sondas de ARNc de ratones individuales de las diferentes líneas fundadoras (líneas A, B, C y D de Thy-SwedishArcticAPP) y ratones no transgénicos, como se denota para cada ratón individual encima de la correspondiente señal fotográfica (izquierda) y la estimación cuantitativa de estas señales para medir el número de copias de las diferentes líneas fundadoras de ratones Thy-SwedishArctic-APP (derecha).

Fig. 3 Gráfica que representa la proteína APP con el dominio kunitz (sombreado) que permite el corte y empalme alternativo de APP. El dominio de los péptidos A β (negro) reside parcialmente en el interior del dominio transmembrana. Se indican las localizaciones de los epítomos de los anticuerpos APP usados en el experimento. En la isoforma de proteína APP770, se localizan los epítomos entre los aa 66-81 (22C11) y el aa 672-687 (6E10). Los anticuerpos 22C11 detectan APP tanto humano como murino endógeno, mientras que el anticuerpo 6E10 detecta únicamente APP humano. La transferencia Western muestra el aumento de expresión relativa tres veces de APP en el cerebro del ratón transgénico Thy-SwedishArctic-APP, línea fundadora B. La tinción de Coomassie ("Cooma.") es una medida de la proteína total cargada en el gel (**A**). Se verificó la presencia de APP humana y de péptidos Arctic A β en el cerebro del ratón transgénico Thy-SwedishArctic-APP, línea fundadora B ("B") y la ausencia en el cerebro del ratón no transgénico ("ntr") (**B**) mediante tinción con el anticuerpo 6E10. Ya que dicho anticuerpo detecta únicamente la presencia de APP humana, se verificó de esta manera la funcionalidad del transgén.

Fig. 4: Proteína APP en ratón transgénico Thy-SwedishArctic-APP joven. Expresión de la proteína APP en el cerebro de un ratón Thy-SwedishArcticAPP de 1 mes de edad, línea fundadora B (a – hemisferio izquierdo y b – hipocampo) y un ratón no transgénico (c – hipocampo) teñido con 6E10 (epítipo 1-16 en A β , este anticuerpo es específico de APP y A β humanas). La tinción visualiza la distribución neuronal de la síntesis de proteína APP en el cerebro.

Fig. 5: inmunotinción puntuada de A β intraneuronal que muestra la agregación de A β en la corteza cerebral en el ratón Thy-SwedishArctic APP (a, marcada por flechas) de acuerdo con la presente invención y un ratón transgénico Swedish APP (**b y c**). Los ratones tenían la misma expresión de APP y el modelo de expresión anatómica (tanto estos parámetros como el de la edad con una fuerte influencia de los fenotipos EA en cualquier modelo de ratón transgénico). Se encontró poco o muy poco A β intraneuronal en un ratón Thy-Swedish APP de 2 meses de edad (b). Algunas neuronas corticales contienen agregados A β intraneuronales a los 15 meses de edad en ratón transgénico Thy-Swedish APP (c), pero todavía muy débil y menos frecuente que en el ratón transgénico Thy-SwedishArctic APP a los 2 meses de edad (a). No se encontró inmunotinción de A β en ratones no transgénicos (**d**). (**e**) representa una vista superior de agregados A β en el hemisferio derecho de un cerebro de un ratón transgénico Thy-SwedishArctic-APP. Las flechas apuntan a la pronunciada tinción inmunoreactiva de A β resistente a ácido fórmico en neuronas piramidales CA1 del Thy-SwedishArctic APP. La barra de la escala mide 20 μ m (**a-d**).

Fig. 6: Proteína A β en ratón transgénico Thy-SwedishArctic-APP de 2 meses de edad (línea fundadora B) y ratón transgénico Thy-Swedish-APP. La extracción química secuencial de tejido cerebral muestra que la mayor parte de A β en el ratón Thy-SwedishArctic-APP es soluble, es decir, se puede recuperar mediante extracción química suave en tampón carbonato y que poco A β permanece en el tejido tras la reextracción en SDS al 1% o ácido fórmico al 70%, es decir, como A β insoluble (a, FA = ácido fórmico). Los niveles de A β 1-40 (**b**) y A β 1-42 (**c**), tal como se midieron mediante ELISA, en ratones transgénicos Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad, se redujeron en comparación con ratón transgénico Thy-Swedish, de la misma edad y que expresa la misma cantidad del transgén (la proteína APP humana). En contraste, los niveles de A β totales, es decir, tanto A β 1-40 como A β 1-42 medidos en conjunto con la transferencia western, presentan un aumento de cinco veces en el tejido cerebral de ratón transgénico Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad en comparación con ratón transgénico Thy-Swedish de la misma edad que expresa la misma cantidad del transgén (la proteína APP humana) (**d**). Los resultados (**b-d**) sugieren fuertemente que agregados A β solubles tales como protofibrillas están presentes en el cerebro del ratón transgénico Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad, debido a que la transferencia western es un procedimiento de desnaturalización en el que agregados A β solubles se disocian en sus componentes individuales, y péptidos A β individuales proporcionan un valor numérico mayor. En contraste, ELISA es una técnica no desnaturalizante, por la cual cada agregado A β soluble se medirá como una única unidad y el valor numérico será inferior.

Fig. 7: La A β puntuada intraneuronal (marcada mediante flechas en **A-D**) es muy fuerte y frecuente en Thy-Swedish-Arctic APP tanto a los 2 meses (**B**) como a los 5 meses (**D**) de edad. En contraste, la inmunotinción intraneuronal de Thy-Swedish APP (emparejada para la expresión del transgén de APP), A β tanto a los 2 meses (**A**) como a los 5 meses (**C**) de edad es infrecuente y escasa. El análisis de cuantificación de imágenes (**E**) muestra un aumento de 7 veces o más en la inmunotinción puntuada de A β intraneuronal en Thy-SwedishArctic APP (barras sólidas) en comparación con Thy-Swedish APP (barras abiertas).

Fig. 8: Gráfica que muestra que un aumento en la agregación de A β intraneuronal precede un aumento en la deposición de la placa de A β extracelular durante al menos 2 meses. Se cuantificó la fracción de área de la

agregación de A β intraneuronal en las neuronas piramidales CA1 (eje y a la izquierda) y la frecuencia de deposición de la placa de A β extracelular en el hipocampo (eje y a la derecha escala logarítmica) en una cohorte de ratones transgénicos Thy SwedishArctic APP de diversas edades. Cada cuadrado sólido representa la A β intraneuronal (% de fracción del área) de un único ratón, mientras que el correspondiente cuadrado abierto localizado por debajo representa la frecuencia de la placa de A β en el mismo ratón. El resultado representa el promedio \pm S.E.M. del análisis de algunas secciones de tejido de ratones transgénicos individuales.

Fig. 9: Diagrama de dispersión que muestra el promedio del grupo (línea) y la distribución entre individuos del peso del cerebro del hemisferio izquierdo tal como se diseccionó de las cohortes de ratones transgénicos Thy-SwedishArcticAPP y Thy-SwedishAPP a los 2 meses de edad. Los ratones transgénicos Thy-SwedishArcticAPP muestran un peso cerebral reducido (221 ± 9 mg; n=9), en comparación con ratones transgénicos Thy-SwedishAPP (239 ± 5 mg; n=8), lo que sugiere cambios atróficos en los cerebros de ratones transgénicos Thy-SwedishArctic APP, tal como se observó normalmente en un cerebro humano que padecía la patogénesis de la EA.

Fig. 10: Placas seniles extracelulares en el hipocampo de un ratón transgénico Thy-SwedishArcticAPP a los 7 meses de edad. Se observó la inmunoreactividad de A β con dos anticuerpos diferentes que eran específicos de los fragmentos de aminoácidos cortos en los extremos C-terminales de A β 42 (a) y A β 40 (b) y de esta manera no detectan APP o los fragmentos de APP (Näslund y col., 2000). La inmunoreactividad de A β fue resistente a y se potenció mediante pretratamiento con ácido fórmico concentrado. Las flechas apuntan a depósitos inmunoreactivos de A β que se mostraron a mayor aumento (**imágenes entre a y b**). La inmunotinción de Rojo Congo y GFAP combinados muestra una astrogliosis robusta que rodea una placa amiloide compacta (c), que muestra una birrefringencia oro-verde clásica en luz polarizada (d).

Descripción detallada de la invención

Los transgenes de acuerdo con la presente invención comprenden una secuencia de polinucleótidos, más específicamente un polipéptido APP heterólogo que comprende las mutaciones descritas en el presente documento, y se unen de manera operable a un promotor de la transcripción capaz de producir la expresión del polipéptido APP heterólogo en el tejido cerebral del ratón transgénico.

Dicho promotor puede ser constitutivo o inducible y puede afectar la expresión de un polinucleótido de una manera específica de tejido. Los promotores específicos de tejidos incluyen, sin limitación, el promotor de la enolasa específico de neurona (NSE), el promotor de la cadena ligera de neurofilamento (NF-L) y de la cadena pesada de neurofilamento (NF-H), el promotor de la proteína priónica (PrP), el promotor de la tirosina hidroxilasa, el promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el promotor de la glucoproteína thy1, el promotor de la β actina, el promotor de la ubiquitina, el promotor del virus 40 de simio (SV40), y los promotores específicos de genes tales como el promotor de APP.

Las proteínas precursoras amiloides (APP) comprenden un grupo de glucoproteínas transmembrana expresadas de manera ubicua cuya heterogeneidad surge del corte y empalme alternativo y del procesamiento después de la traducción [Selkoe, D. J. (1994) NCBI, número de acceso P=5067, SEQ ID NO: 1]. Además de las formas de corte y empalme de los restos 751 y 770 que se expresan mucho en células no neuronales a lo largo del cuerpo, las neuronas expresan más abundantemente la isoforma del resto 695. Todas las isoformas son precursoras de diversos metabolitos que son el resultado de diferentes condiciones fisiológicas o patológicas inducidas por escisión proteolítica. La propia APP, tal como se usa de acuerdo con los principios de esta invención, puede ser cualquiera de las formas de corte y empalmen alternativas de esta molécula y se puede usar tanto como forma glicosilada o no glicosilada.

En una forma de realización adicional, el animal comprende una construcción directora integrada de manera homóloga en una localización cromosómica endógena con el fin de potenciar los niveles de los péptidos A β -40 y/o A β -42 Arctic, mediante aclaramiento desvirtuado, por ejemplo, mediante la ablación del gen (inactivación) de los genes de la enzima neprilisina y/o que degradan la insulina (IDE) en los tejidos de dichos animales transgénicos que albergan la mutación Arctic (E693G) y generar por tanto un fenotipo similar al del descrito en la invención, es decir, la agregación de A β temprana y aumentada.

Antes de la transfección, dichos transgenes adicionales se cruzan con el transgén que comprende la mutación Arctic.

[0028] La invención proporciona además un ratón transgénico que alberga una copia de un transgén de la invención integrada de forma tanto homóloga como no homóloga en una localización del cromosoma endógeno de tal manera que produce péptidos Arctic A β . Dichos animales transgénicos se producen normalmente introduciendo el transgén o la construcción directora en un huevo fertilizado o embriocitoblasto, normalmente mediante microinyección,

electroporación, lipofección, o biolística.

Los ratones transgénicos de acuerdo con la presente invención tienen al menos un alelo APP endógeno inactivado, son preferiblemente homocigóticos para los alelos APP inactivados, y son sustancialmente incapaces de dirigir de eficiente expresión del APP endógeno (es decir, natural).

5 En una forma de realización preferida, un ratón transgénico es homocigótico para los alelos APP endógenos inactivados y sustancialmente incapaz de producir APP de murino codificado por un gen APP endógeno (es decir, que se produce naturalmente). Dicho ratón transgénico, que tiene inactivados los genes APP endógenos es un receptor hospedador preferido de u transgén que codifica un polipéptido APP heterólogo, preferiblemente una
10 mutación Arctic humana y la mutación Swedish APP (KM670/671NL) (numeración APP770) para potenciar la producción del péptido A β 40 y A β -42 Arctic.

Se puede sustituir dicha mutación Swedish por mutaciones similares tales como KM670/671DL, KM670/671DF, KM670/671DY, KM670/671EL, KM670/671EF, M670/671EY, KM670/671NY, KM670/671NF, KM670/ 671KL (numeración APP770)

15 Sin embargo, la mutación Swedish (KM670/671NL) es actualmente la mutación que es la más preferible combinada con la mutación Arctic.

Los compuestos encontrados que tienen un efecto sobre la expresión del péptido A β Arctic, o para promover o inhibir cualquiera de los diversos efectos bioquímicos de los péptidos A β Arctic y/o de las formas agregadas de los péptidos A β Arctic tales como protofibrillas A β , se ensayan y se usan adicionalmente a continuación en el tratamiento de la EA y/o de los trastornos neurológicos relacionados.

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se pueden usar el animal transgénico o su progenie como puntos de partida para el diseño racional de fármacos para proporcionar ligandos, fármacos terapéuticos u otros tipos de pequeñas moléculas químicas así como proteínas, anticuerpos o productos naturales. Alternativamente, pequeñas moléculas u otros compuestos tal como se ha descrito e identificado anteriormente mediante los ensayos de
25 cribado anteriormente descritos pueden servir como compuestos "compuestos principales" en el diseño de fármacos racionales.

Ejemplos

Procedimientos generales

Se siguieron por lo general técnicas de biología molecular normalizadas conocidas en la materia, como en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), y en Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989) y que no se describen específicamente en el presente documento. Se siguieron técnicas transgénicas normalizadas para la introducción de un gen extraño en huevos fertilizados de ratón conocidos en la materia y que no se describen específicamente como en Nagy y col., Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1986, 1994, 2002), ISBN 0-87969-574-9. (**Figs. 1 y 2**). Se siguieron procedimientos generales en inmunohistoquímica Se siguieron generalmente procedimientos normalizados conocidos en la materia y que no se describen específicamente como en Stites y col. (eds), Basic and Clinical Immunology (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1994) y Johnstone y Thorpe, Immunochimistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982 (**Figs. 4-5, 7-8 y 10**).

Subclonación de vectores de expresión Thy-SweArcAPP

40 Las construcciones transgénicas usadas para este estudio contienen el vector de expresión Thy-1 de murino y los ADNc de APP. Se usó la isoforma APP695, que es la isoforma APP predominante en el cerebro. Se hicieron modificaciones en el clon de ADNc de APP humano (Kang y col., 1987) entre Nrul (+145nt) y Smal(+3100) con la extensión enzimática del cebador usando el kit de mutagénesis Transformer (Clontech). Se usaron los siguientes cebadores:

45 CACTCGGTGCC CCGCGCGCGGCCGCCATGCTGCCCGGTTTGGC (SEQ ID NO: 2) y CATAAATAAATTAATAAAATAACCGCGCGCGCAGAAACATACAAGCTGTGTCAG (SEQ ID NO: 3) para incorporar sitios NotI flanqueantes y una secuencia Kozak para el inicio mejorado de la traducción

50 CAAATATCAAGACGGAGGAGATATCTGAAGTGAAATCTGGATGCAGAATTCCGAC (SEQ ID NO: 4) para introducir la mutación KM670/671NL y CAAAATTGGTGTCTTTGCAGGAGATGTGGGTTCAAACAAAG (SEQ ID NO: 5) para introducir la mutación E693G. Se seleccionaron inicialmente los clones mediante la PCR seguido por la digestión de la enzima de restricción y se comprobaron los clones seleccionados mediante la secuenciación del ADN a través de

la región de codificación completa de la proteína precursora amiloide (APP). Se digirieron finalmente los clones correctos con NotI, se ligaron enromados en el extremo en el sitio XhoI del casete de expresión Thy1. Se linealizó la construcción de ADN con NotI para permitir eliminar las secuencias estructurales del vector del casete de expresión. Tras la purificación del gel de β -agarosa (SeaPlaque GTG) con β -agarasa (Invitrogen) y extracción con fenol-cloroformo se microinyectó la construcción de ADN linealizado (2 μ g/ml) en oocitos pronucleares de la línea B6-CBA-F1 de ratón híbrido (B&M, Dinamarca). Se prefiere la técnica de microinyección pronuclear. Se inyectaron unidades de transcripción de una construcción de ADN recombinante de la invención en pronúcleos de embriones animales y se reprodujeron los transgénicos fundadores obtenidos para establecer la línea transgénica.

Genotipificación de camadas

Se genotipó la descendencia resultante cortando puntas de la cola de individuos destetados, extrayendo el ADN usando un kit de extracción de ADN Quiagen y se analizaron con la PCR a través de la secuencia de codificación de APP y el promotor basal de la glucoproteína Tht-1. Se diseñaron dos parejas de cebadores Thy-1 Prom (GAATCCAAGTCGGAAGCTCTT, SEQ ID NO: 6) junto con APP-SQ6 (TGTCAGGAACGAGAAGGGCA, SEQ ID NO: 7), y también APP-SQ3 (GCCGACCGAGGACTGA-CCAC, SEQ ID NO: 8) junto con APP-SQ7 (GACACCGATGGGTAGTGAA, SEQ ID NO: 9) (**Fig. 1**).

Cuidado animal y disección y manipulación del tejido cerebral

Se anestesiaron ratones transgénicos SwedishArcticAPP con 0,4 ml de Avertin (25 mg/ml) comprobado para la pérdida de reflejos espinales y a continuación se perfundieron intracardialmente con solución salina al 0,9%. Se preparó el cerebro y se cortó en dos hemisferios; uno de ellos se sumergió en PFA al 4% (paraformaldehído)/1 x SPB (Tampón Fosfato de Sorensens, KH_2PO_4 23 mM, Na_2HPO_4 70,5 mM X $2\text{H}_2\text{O}$, NaN_3 5 mM, pH 7,4) durante la noche, 4°C. Después de esto, el cerebro se transfirió secuencialmente y se sumergió en Sacarosa al 10%, 20% y 30% (peso/volumen)/0,1 X solución de SPB durante cada noche. Se llevó a cabo el procedimiento de la sacarosa para preservar mejor la morfología del tejido tras la congelación. El cerebro se mantuvo en una solución de sacarosa al 30% hasta que se cortaron las secciones del criostato.

Análisis de la proteína

Se diseccionaron los hemisferios izquierdos de los cerebros de las diferentes líneas fundadoras y se pesaron (**Fig. 9**) (así como los otros órganos medidos). Se extrajo el tejido cerebral en Tween-20 al 0,2% en 1 x PBS con comprimidos inhibidores de la proteasa (número de catálogo 1836153, Roche, un comprimido es suficiente para una solución de extracción de 10 ml) (**Fig. 3**). La relación de extracción era de 1:10 (peso del tejido; tampón de extracción) y se extrajo el tejido en 2 x 10 lotes en hielo. Las soluciones de extracción se centrifugaron a 17900 g a 4°C durante 15 min. Los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C. Alternativamente, los tejidos cerebrales usados para la transferencia western se homogeneizaron en 1:10 (relación volumétrica de extracción del tejido) en Na_2CO_3 100 mM con NaCl 50 mM (pH 11,5) con inhibidores de la proteasa, se centrifugaron a 100.000 g a +4°C durante 1 h y los sobrenadantes se almacenaron congelados a -80°C antes del análisis. Se volvió a extraer el residuo en SDS al 2% y se sonicó de manera breve, se centrifugó tal como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se volvió a extraer el residuo insoluble en SDS en ácido fórmico al 70% (**Fig. 6**). Todas las muestras (cada una ~ de 40 μ g) se desnaturalizaron añadiendo mercaptoetanol al 1% y 1 X Tampón de muestra (concentración final), se mezclaron las muestras y se hirvieron durante 5 min y a continuación se cargaron en un gel de Tris-Glicina al 4-20% (Invitrogen). 1 X Tampón de muestra contiene Glicerol al 10%, SDS al 2%, Tris-HCl 50 mM y Bromofenol azul (diluido x40 procedente de una disolución madres al 1,5%). El tampón de avance en SDS-PAGE usado incluye Tris-base 250 mM, Glicina 1,9 M y SDS 35 mM (Dodecil Sulfato de Sodio). Se hizo avanzar el gel a 96V. Se prehumedeció un filtro de nitrocelulosa en ddH_2O y a continuación se equilibró en tampón 1 X Transferencia (Tris-base 30 mM, Glicina 230 mM, pH 8,3) con metanol al 20%. Se ensambló el conjunto de transferencia en un tampón de transferencia y se hizo avanzar la transferencia a 55V, 4°C durante la noche. Antes de las incubaciones con el anticuerpo, se hirvió el filtro de nitrocelulosa en 1xPBS durante 5 min, para estabilizar y aumentar la exposición a los epítomos en A β . A continuación se bloqueó el filtro en leche en polvo desnatada al 1% p/v preparada recientemente, Tween-20 al 0,1% en 1X tampón-TBS (Tris básico 100 mM, NaCl al 0,9%, pH 7,5) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubó el filtro con anticuerpo primario (0,5 μ g/ml de 6E10 o 2 μ g/ml de 22C11) en Tween-20 al 0,1% en 1 X tampón TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se siguió esto por un lavado 3-4 veces (5 min) a temperatura ambiente con Tween-20 al 0,1% en 1 X tampón TBS. El anticuerpo secundario, 0,2 μ g/ml de IgM-HRP dirigida contra IgG de ratón (Pierce), a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 1% p/v, Tween-20 en tampón 1 X TBS, y se incubó el filtro en esta solución durante 30 min. A continuación se lavó el filtro tres veces más en Tween-20 al 0,1% en tampón 1 X TBS, y la última fue un enjuague final en tampón 1 X TBS sin Tween antes de la incubación de 5 min en SuperSignal (Pierce-ECL). Se dejaron proceder todas las incubaciones sobre una plataforma en agitación. El filtro de la transferencia resultante se incubó finalmente frente a una ECL-Hyperfilm (Amersham) (**Fig. 3, 6**). ELISA de A β : Se analizaron los extractos de tejido

cerebral soluble en SDS para los niveles de A β 1-40 y A β 1-42 con ELISA usando los kits ELISA del beta Amiloide 1-40 y 1-42 (Signet Laboratories), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para asegurar el mismo reconocimiento de los epítomos entre Arctic y A β natural mediante los anticuerpos usados en el ELISA, se analizaron diluciones en serie de A β 1-40 Arctic sintético y A β 1-40 natural en su forma monomérica con el kit ELISA del Beta Amiloide 1-40.

Inmunohistoquímica

Se llevaron los hemisferios cerebrales de las líneas fundadoras a una etapa de congelación y se cortaron secciones de 25 μ m con un microtomo de deslizamiento y se almacenaron a +4°C hasta el uso. Para la inmunotinción se utilizó un kit M.O.M de Vector. Las secciones de tejido fijo congelado se incubaron en tampón citrato precalentado (25 mM, pH 7,3) durante 5 min a 85°C. Se siguió esto por un enjuague en 1 X PBS. Las secciones de tejido fijo congelado se incubaron en ácido fórmico concentrado (96%) durante 5 min a TA y a continuación se enjuagaron en agua durante 10 min. Después las secciones se incubaron con H₂O₂ (0,3%) en un bloque de DAKO al 50%/1 X PBS al 50 % durante 15 min a temperatura ambiente para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Se enjuagaron de nuevo una vez las secciones de cerebro en 1 X PBS antes de la incubación con un Reactivo de Bloqueo M.O.M de IgG de ratón durante 1 h para bloquear la unión no específica. A continuación se permeabilizaron las secciones con 1 X PBS (pH 7,4) + Triton X-100 al 0,4%, y se enjuagaron brevemente durante 5 min dos veces en 1 X PBS (pH 7,4) para aumentar la tensión superficial. Se usó diluyente M.O.M. de Ratón durante la incubación de 5 min para bloquear la unión no específica y se eliminó con un trapo el exceso. Se dejó proceder la incubación con 0,2 μ g/ml de 6E10, 14 μ g/ml de GFAP (clon G-A-5; 1 x 1500) 1,5 μ g/ml de anticuerpos A β 42 y 1,7 μ g/ml de anticuerpos A β 40 (anticuerpos primarios) en diluyente MOM (Triton X-100) al 0,1%, durante la noche a 4°C. Tras otro lavado con tampón 1XPBS, se incubaron las secciones con reactivo biotinilado con M.O.M. dirigido contra IgG de ratón o IgG de conejo en diluyente M.O.M./Triton X-100 al 0,1% durante 8 min. Se enjuagaron las secciones una vez más en tampón 1XPBS. Se dejó proceder la incubación con un lapso de 30 min con el complejo ABC del kit M.O.M. (complejo de avidina-biotina, seguido por un enjuagado en 1xPBS. Después de eso, se usó un kit con un sustrato basado en peroxidasa de rábano picante (NOVA Red, Vector) para desarrollar la tinción durante 10 min. Finalmente, se lavaron brevemente las secciones en ddH₂O, se deshidrataron en EtOH al 70%, 95%, 99,5%, se dejaron secar al aire, se deshidrataron en xileno y se montaron en DPX (Dibutil Ftalato Xileno, VWR) montando el medio para el microscopio óptico. Todas las incubaciones anteriores, a no ser que se establezca de otra manera, se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en una plataforma de agitación (**Figs. 4-5, 7-8 y 10**). Se llevó a cabo la tinción del Rojo Congo incubando secciones de tejido con disolución alcalina saturada de cloruro de sodio (NaOH 10 mM) durante 20 min seguido por Rojo Congo (0,2% p/v) en disolución alcalina saturada de cloruro de sodio (NaOH 10 mM) durante 15 min y deshidratación en EtOH al 70%, 95%, 99,5%. Se dejaron secar al aire las secciones de tejido, se deshidrataron en xileno y se montaron en DPX (Dibutil Ftalato Xileno, VWR) montando el medio para el microscopio óptico con luz polarizada.

Análisis por imágenes (Figs. 7-8)

Se investigaron secciones de tejido coronal separadas por igual a lo largo del eje rostral-caudal del hipocampo, 4-5 secciones de tejido de cada animal, capturando cuatro campos de imágenes diferentes de cada sección de tejido separada. Las imágenes de la tinción inmunoreactiva de 6E10 A β se capturaron a un aumento de 400X en un microscopio Leica con una cámara CCD de color enfriada a unas configuraciones de luz y filtro definidas. Las imágenes capturadas de agregados A β intraneuronales en las neuronas piramidales CA1 en el hipocampo dorsal se convirtieron a imágenes en la escala de los grises, se procesaron con función de delineación para enfocar bordes y permitir una segmentación precisa. Se segmentaron las imágenes con un comando de umbral automático (Qwin, Leica). Los resultados se expresan como fracción de área (área_{tot} teñida/área_{tot} medida expresada en %) y se presentaron como promedio \pm S.E.M. entre las secciones de tejido analizadas de cada ratón transgénico individual

RESULTADOS

Cribado mediante la PCR

Los resultados de la genotipificación mediante PCR se observan a la derecha (Fig. 1). Ambos conjuntos de cebadores identificaron 4 ratones fundadores (de 13) que tenían la construcción mThyl-SwedishArctic-hAPP y se establecieron estas cuatro líneas fundadoras. Líneas A-D de Thy-SwedishArcticAPP. Se podrían detectar parejas de cebadores con fragmentos de ADN de 428 pb de longitud en la dirección 5' (**A**) y 441 pb de longitud en la dirección 3' (**B**). Se genotipó la descendencia de cada línea fundadora de la misma manera (Fig. 1).

Transferencia en hendidura

Se analizaron numerosas copias en la descendencia positiva del transgén individual usando la transferencia en

hendidura. Las cuatro líneas fundadoras Thy-SwedishArcticAPP incorporaban números variantes de copias de ADN, teniendo la línea fundadora B el número más elevado de copias (41 ± 2), teniendo en cuenta que los ratones no transgénicos tienen dos copias del gen Thy1 endógeno (**Fig. 2**).

Transferencia Western y ELISA

5 Se muestran APP humana y A β de síntesis procedentes de los extractos cerebrales de las diferentes líneas fundadoras Thy-SwedishArctic. El dibujo ilustra la proteína precursora amiloide (APP) y los epítomos dentro de APP que están dirigidos por los anticuerpos. En la isoforma de la proteína APP770, los epítomos dirigidos son los amino
10 66-81, para 22C11, y los aminoácidos 672-687, para 6E10. Se ha analizado la intensidad de las manchas con el software de imágenes Scion y se ha calculado la expresión en exceso con respecto a APP en las diferentes líneas fundadoras. Se ha confirmado la misma carga de los geles con la tinción de Coomassie y el análisis de la proteína total. Se puede estimar la expresión relativa a APP con el anticuerpo 22C11 que permite la detección del APP murino endógeno y del transgén APP humano. En contraste, el anticuerpo 6E10 detecta únicamente el transgén APP humano y los péptidos A β . Se encontró que la línea fundadora B Thy-SwedishArcticAPP mostraba una
15 expresión de APP en exceso de 3 veces (**Fig. 3**). La extracción química secuencial de tejido cerebral de ratón transgénico Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad muestra que la mayor parte de A β es soluble, es decir, se puede recuperar mediante extracción química suave en tampón carbonato y que permanece poco A β en el tejido tras la reextracción en SDS al 1% o ácido fórmico al 70%, es decir, como A β insoluble (**Fig. 6, a**). Los niveles de A β 1-40 (**Fig. 6, b**) y A β 1-42 (**Fig. 6, c**) tal como se midieron mediante ELISA, en ratón transgénico Thy-SwedishArctic, se redujeron en comparación con ratones transgénicos Thy-Swedish que son de la misma edad y expresan la misma cantidad del transgén (la proteína APP humana). En contraste, los niveles de A β totales, es decir, A β 1-40 y A β 1-42 medidos en conjunto con la transferencia western, aumentaron cinco veces en los tejidos cerebrales de ratones transgénicos Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad en comparación con ratones transgénicos Thy-Swedish que son de la misma edad y que expresan la misma cantidad del transgén (la proteína APP humana) (**Fig. 6, d**). Los resultados (**Fig. 6, b-d**) sugieren con fuerza que agregados A β solubles tales como
20 protofibrillas están presentes en el cerebro de ratones transgénicos Thy-SwedishArctic de 2 meses de edad, debido a que la transferencia western es un procedimiento de desnaturalización que el que agregados A β solubles se disocian en sus componentes individuales, es decir, péptidos A β individuales que proporcionan por tanto una mayor medida numérica. En contraste es no desnaturalizante, y cada agregado A β soluble se medirá como una única unidad y para el número total de sus componentes individuales.

Inmunohistoquímica

Se presentan los resultados de la inmunohistoquímica de APP que se observan en la línea B fundadora de ratón Thy-SwedishArcticAPP (**Fig. 4, a-b**), aunque sol es aparente una difusa tinción de fondo en un ratón no transgénico de la misma camada (**Fig. 4, c**). La inmunotinción intraneuronal puntuada de A β muestra la agregación de A β en la corteza cerebral de un ratón Thy-SwedishArctic APP de 2 meses de edad (**Fig. 5, a**), marcada por flechas). Poco o
35 muy poco A β intraneuronal en ratón Thy-Swedish APP de 2 meses de edad con una expresión de APP igual (**Fig. 5, b**). Algunas neuronas corticales contienen agregados A β intraneuronales a los 15 meses de edad en el ratón Thy-Swedish APP (**Fig. 5, c**). No se encontró inmunotinción de A β en ratones no transgénicos (**Fig. 5, d**). Los inventores encontraron inclusiones inmunopositivas de A β intraneuronal en la capa de células piramidales de CA1 en el hipocampo y en neuronas dispersas de la lámina inferior en la corteza cerebral en el ratón transgénico Thy-SweArcAPP (**Fig. 5, e**). La tinción inmunopositiva de A β es resistente a pretratamiento con ácido fórmico concentrado, lo que es una característica típica del amiloide, es decir, de agregados A β con una estructura en lámina β . La barra de escalas mide 20 μ m (**Fig. 5, a-d**). La inmunotinción intraneuronal puntuada de A β (marcada por flechas en la Fig. 5, **a-d**) muestra la agregación de A β en el hipocampo de una ratón transgénico Thy-SwedishArctic APP de 2 meses de edad (**Fig. 7, b**) y de 5 meses de edad (**Fig. 7, d**). Poco y muy poco A β intraneuronal en un ratón Thy-Swedish APP de 2 meses de edad (**Fig. 7, a**) y de 5 meses de edad (**Fig. 7, c**) con una expresión de APP igual. El análisis de imágenes muestra un aumento de 11 veces (2 meses; $1,91 \pm 9,16$ (4) en comparación con $0,17 \pm 0,02$ (3); promedio \pm S.E.M. (n)) y de 7 veces (5 meses; $2,66 \pm 0,28$ (3) en comparación con $0,38 \pm 0,10$ (4); promedio \pm S.E.M. (n) en el porcentaje de área bajo la curva por la inmunotinción de A β intraneuronal en el ratón transgénico Thy-SwedishArctic APP en comparación con el ratón transgénico Thy-Swedish APP (**Fig. 7, e**). Se cuantificó la fracción de área de la agregación de A β intraneuronal en las neuronas piramidales CA1 (eje y a la izquierda) y la frecuencia de deposición de la placa de A β extracelular en el hipocampo (eje y a la derecha, escala logarítmica) en una cohorte de ratones transgénicos Thy-SwedishArctic APP de diversas edades. Cada cuadrado sólido representa el A β intraneuronal (% de fracción de área) de un único ratón, mientras que el cuadrado abierto correspondiente localizado a menudo por debajo representa la frecuencia de la placa de A β en el mismo ratón. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. del análisis de diversas secciones de tejido de ratones transgénicos individuales (**Fig. 8**). Se presentaban también placas seniles extracelulares en la parte caudal del hipocampo del ratón transgénico Thy-SweArcAPP a esta edad, tal como se muestra con los anticuerpos específicos de A β 42 y A β 40 (**Fig. 10, a-b**). La inmunoreactividad de A β fue resistente a y se potenció mediante el

pretratamiento con ácido fórmico concentrado. Las flechas (en la Fig. 10, a-b) apuntan a depósitos inmunoreactivos de A β que se muestran a mayor aumento (**imágenes de la parte media adyacente a 10, a y b**). La inmunotinción de Rojo Congo y GFAP combinados muestra una reacción astrogliótica robusta que rodea una placa amiloide compacta (**Fig. 10, c**), que muestra una clásica birrefringencia de color oro-verde en luz polarizada (**Fig. 10, d**)

5 Peso del cerebro

Se diseccionaron los cerebros y se dividieron en sus dos hemisferios. El diagrama de dispersión muestra el promedio y la distribución entre individuos del peso del hemisferio izquierdo del cerebro. Se analizó bioquímicamente de manera posterior el tejido cerebral para la APP humana y la síntesis de A β . Se pesó inicialmente el hemisferio izquierdo en una balanza, para servir como medida de la degeneración atrófica del cerebro (**Fig. 9**).

Referencias

- Cai y col., Science 259, 514-516 (1993)
- Cairns y col., Neurosci Lett. 149, 137-40 (1993).
- Chartier-Harlan, y col., Nature 353, 844-846 (1991)
- 15 Chishty y col., J Biol Chem. 276, 21562-21570 (2001)
- Citron, y col., Nature 360, 672-674 (1992).
- Corder y col., Science 261, 921-3. (1993)
- DeMattos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10843-10848 (2002).
- Edbauer y col., Nature Cell. Biol. 5, 486-488 (2003).
- 20 Fagan y col., Neurobiol. Dis. 9, 305-318 (2002).
- Games y col., Nature 373, 523-527 (1995).
- Glennner y Wong, Biochem Biophys Res Commun 120, 885-890 (1984).
- Goate y col., Nature 349, 704-706 (1991).
- Holcomb y col., Nat. Med. 4, 97-100 (1998).
- 25 Hsiao y col., Science 274, 99-102 (1996).
- Kang y col., Nature 325, 733-6. 1987)
- Klyubin y col., J. Physiol 551P, C32, commun. (2003)
- Lashuel y col., J. Mol Biol., 332, 795-808 (2003).
- Lantos y col., Neurosci Lett. 137, 221-4 (1992).
- 30 Lorenzo y Yankner y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 12243-12247 (1994).
- Masters y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4245-4249 (1985).
- Mullan y col., Nature Genet. 1, 345-347 (1992).
- Murrell, y col., Science, 254, 97-99 (1991).
- Nilsberth y col., Nat. Neurosci. 4, 887-893 (2001).
- 35 Nilsson y col., J. Neurosci. 21, 1444-1451 (2001).
- Näslund y col., JAMA 283, 1571-1577 (2000).
- Pike y col., Brain Res. 563, 311-314 (1991).

Roher y col., J Biol Chem. Nov 26, solo publicación electrónica (2003)

Scheuner y col., Nat. Med. 2, 864-870 (1996).

Selkoe, D. J., Ann. Rev. Cell Biol. 10,373-403 (1994).

Selkoe, Annu. Rev. Neurosci. 17, 489-517, (1994).

5 Strittmatter y col., Proc. Natl Acad Sci. USA 90, 1977-81. (1993).

Sturchler-Pierrat y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287-13292 (1997).

Suzuki y col., Science 264, 1336-1340 (1994).

Teppner y col., 6ª Conf. Internat. AD/PD, Sevilla, España, Comité 52 (2003)

Walsh y col., Nature 416, 535-539 (2001).

10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un ratón transgénico que expresa un transgén que comprende una secuencia de ADN que codifica una Proteína Precursora Amiloide (APP) heteróloga que comprende la mutación Arctic (E693G) y una mutación patógena adicional de la EA (enfermedad de Alzheimer) seleccionada entre el grupo que consiste en KM670/671DF, KM670/671DY, KM670/671EF, KM670/671EY, KM670/671NL, KM670/671NY, KM670/671NF, KM670/671KL, KM670/671DL and KM670/671EL, y sin mutaciones de APP adicionales, en el que dicho transgén se une de manera operable a un promotor eficaz para la expresión de dicho gen en el tejido cerebral de dicho ratón, lo que da como resultado cantidades crecientes de agregados A13 solubles intracelulares, que incluyen péptidos A β .
- 2.** El ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transgén se integra en el ADN genómico.
- 10 **3.** El ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la APP endógena se expresa o no se expresa.
- 4.** El ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha mutación patógena adicional de la EA es la mutación KM670/671NL de APP.
- 15 **5.** El ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el ratón transgénico expresa únicamente un transgén.
- 6.** El ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente una construcción directora integrada de manera homóloga para al menos uno de los genes de la neprilisina o que degrada la insulina (IDE), que perturba estos genes mediante la ablación del gen (inactivación) y potencia los niveles de los péptidos A β -40 y/o A β -42 Arctic.
- 20 **7.** Un procedimiento de producción del ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende integrar en el ADN genómico un transgén que comprende una secuencia de ADN que codifica una Proteína Precursora Amiloide (APP) que comprende la mutación Arctic (E693G) y una mutación patógena adicional de la EA (enfermedad de Alzheimer) seleccionada entre el grupo que consiste en KM670/671DF, KM670/671DY, KM670/671EF, KM670/671EY, KM670/671NL, KM670/671NY, KM670/671NF, KM670/671KL, KM670/671DL y KM670/671EL y sin mutaciones de APP adicionales, en el que dicho transgén se une de manera operable a un promotor eficaz para la expresión de dicho gen en el tejido cerebral de dicho ratón.
- 25 **8.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la APP endógena se prepara no expresiva.
- 9.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que dicha mutación patógena de la EA adicional es la mutación KM670/671NL de APP.
- 30 **10.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que comprende adicionalmente integrar de manera homóloga una construcción directora para al menos uno de los genes de la enzima neprilisina o que degrada la insulina (IDE).
- 11.** Un procedimiento de cribado, en el que el ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 se usa para cribar los agentes útiles para tratar, evitar o inhibir la enfermedad de Alzheimer.
- 35 **12.** Un procedimiento de cribado, en el que el ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 se usa para cribar los agentes de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Fig. 1
Líneas fundadoras Thy-SwedishArcticAPP

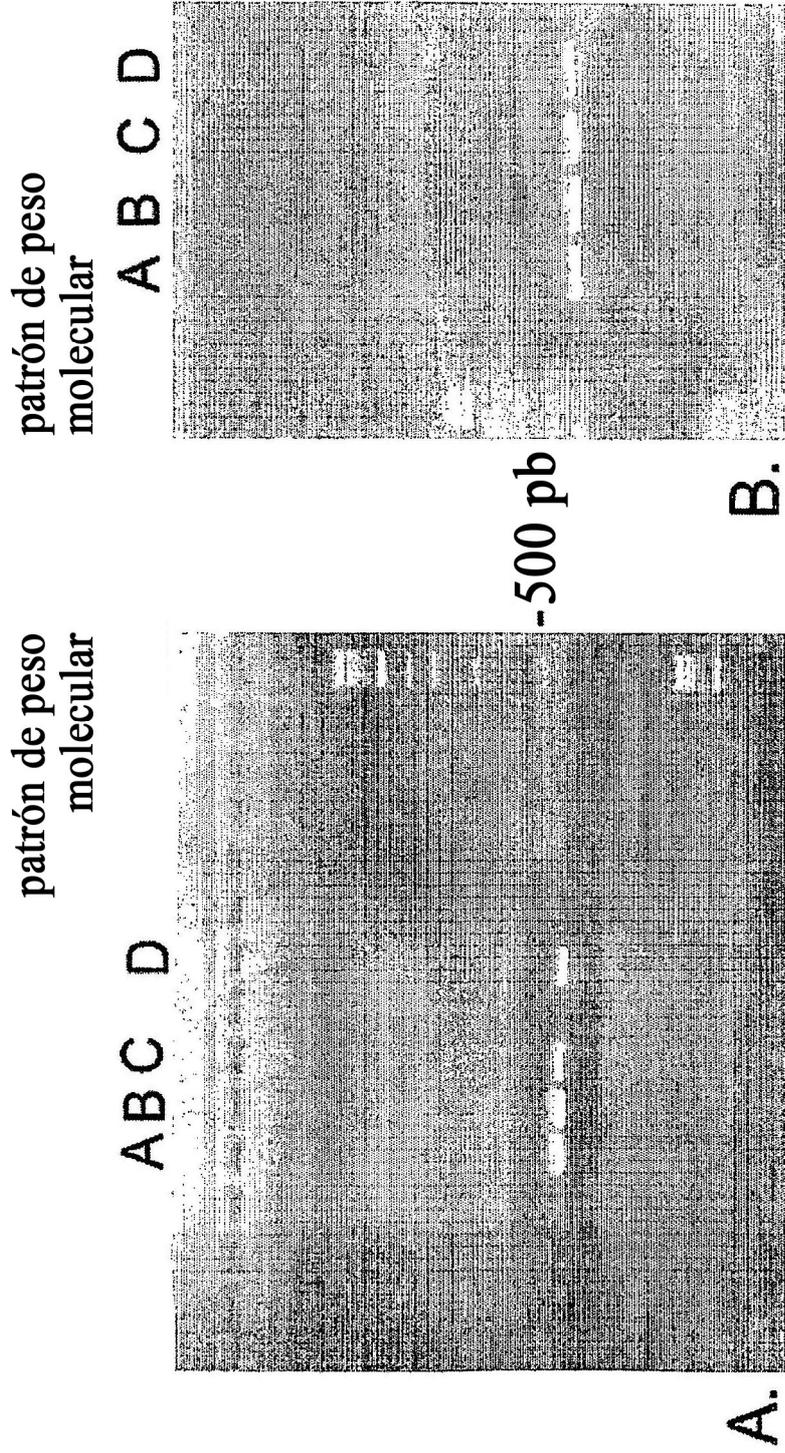


Fig. 2

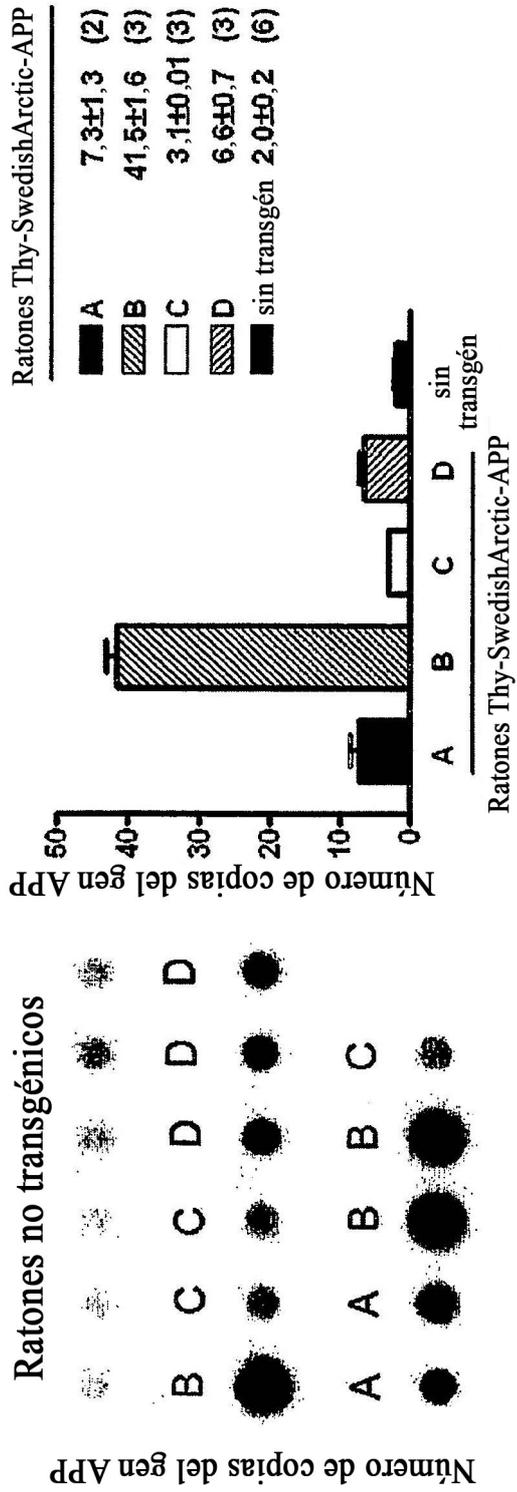


Fig. 3

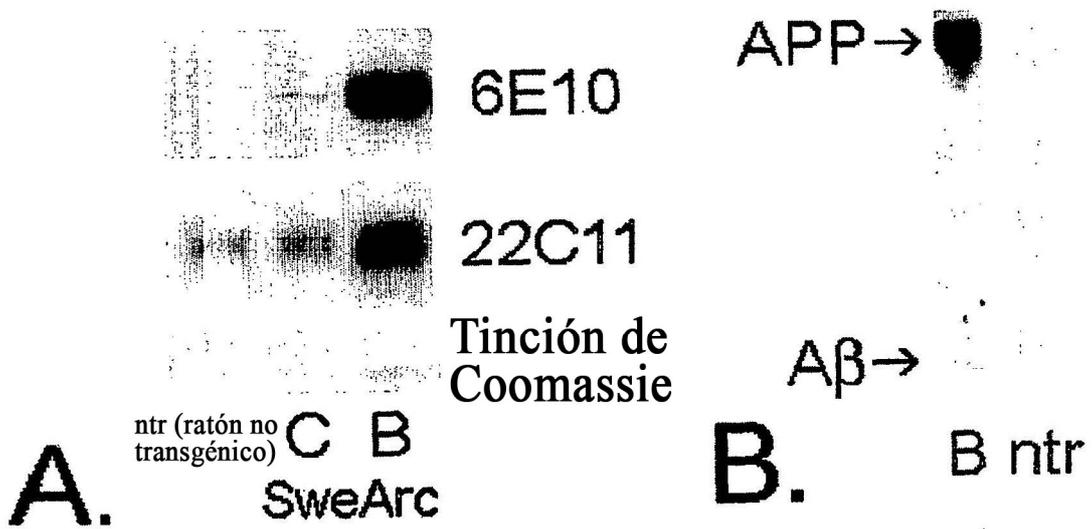
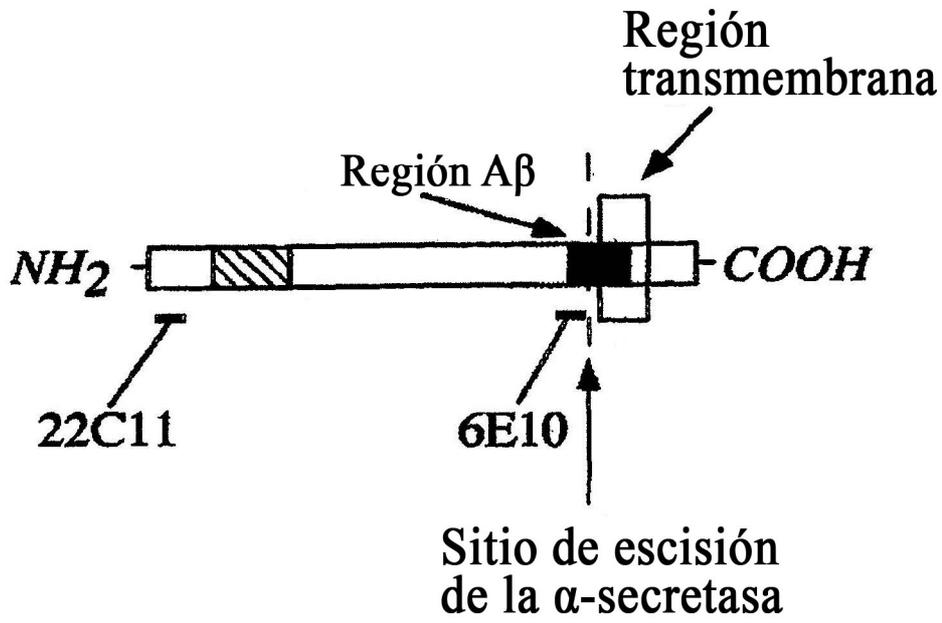


Fig. 5

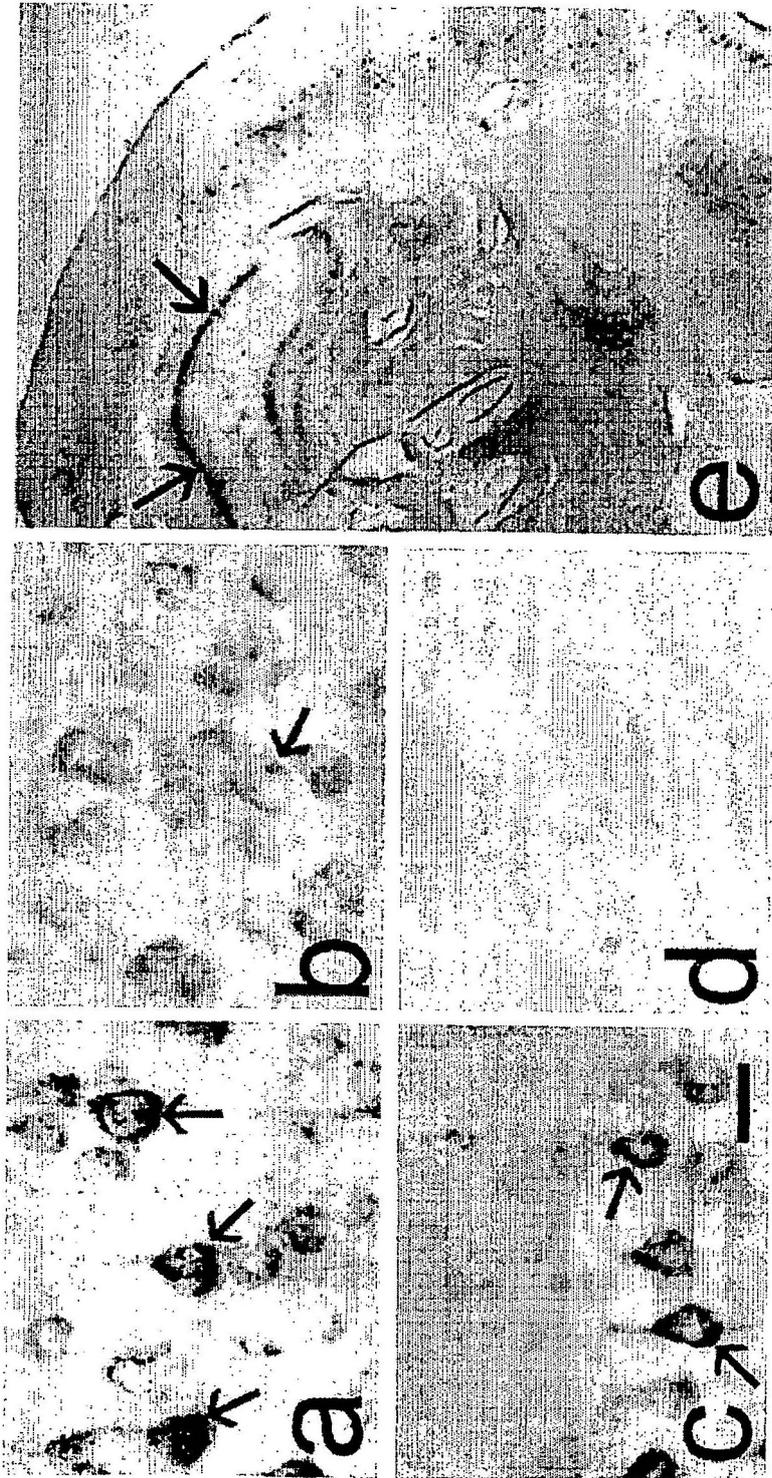


Fig. 6

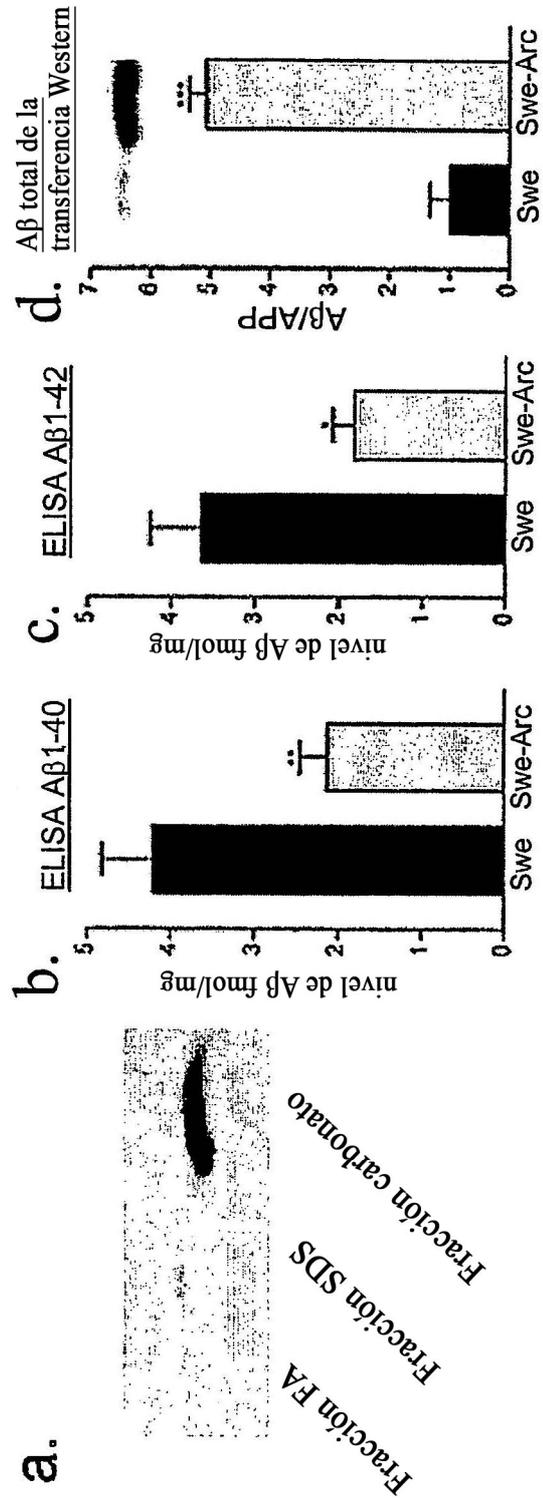
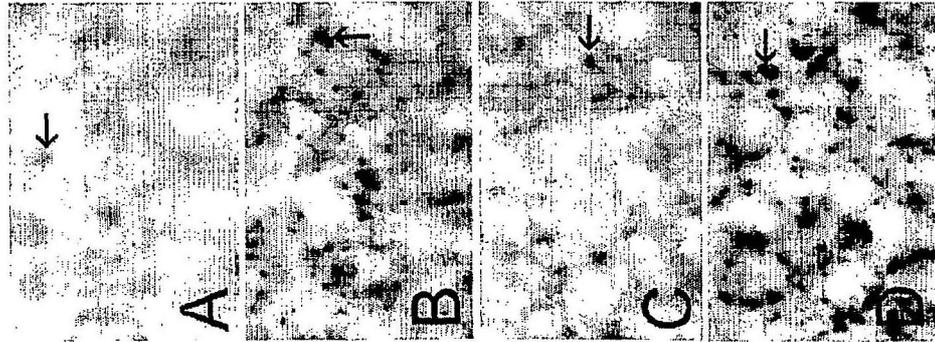
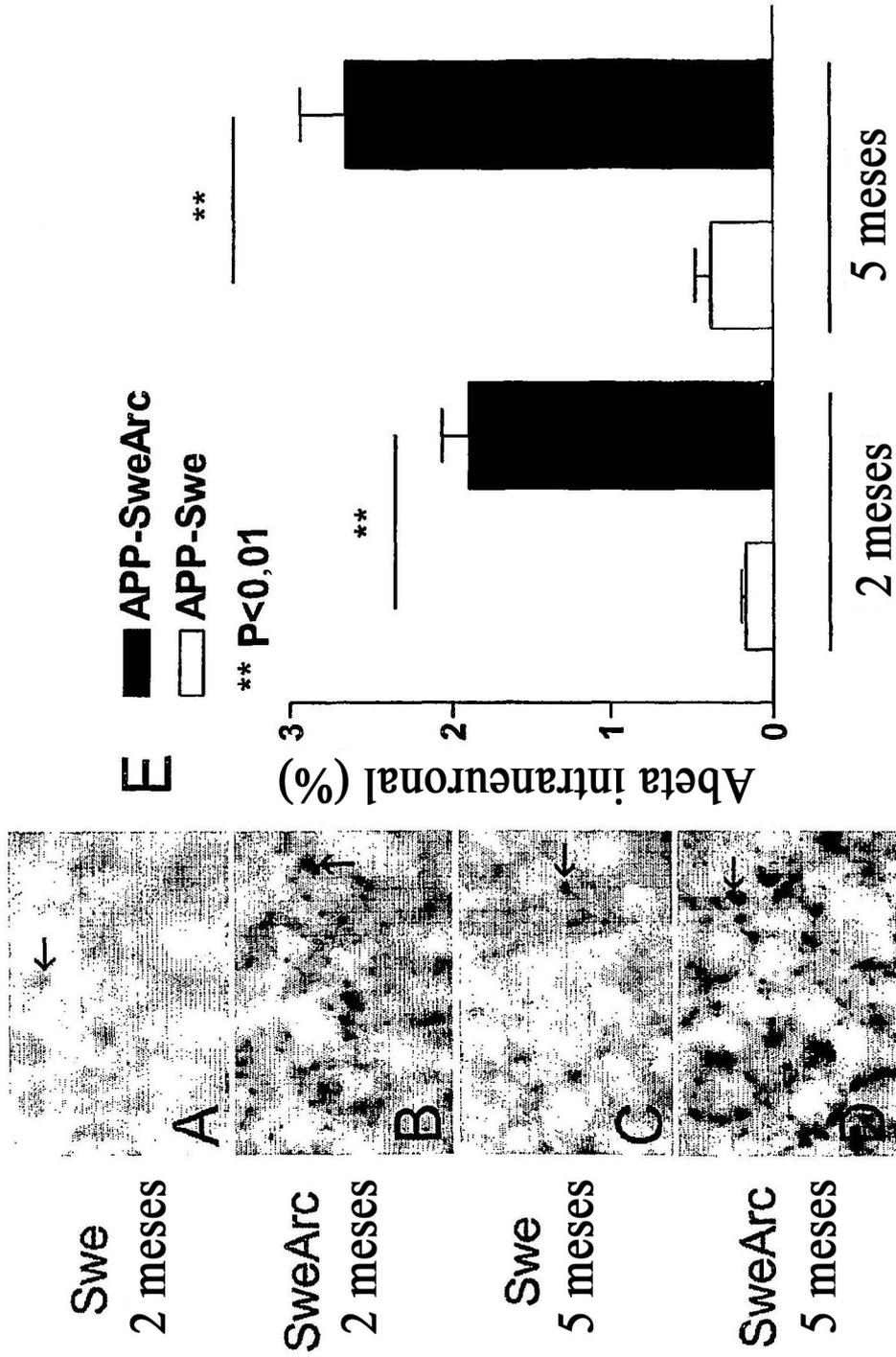


Fig. 7



Swe
2 meses

SweArc
2 meses

Swe
5 meses

SweArc
5 meses

Fig. 8

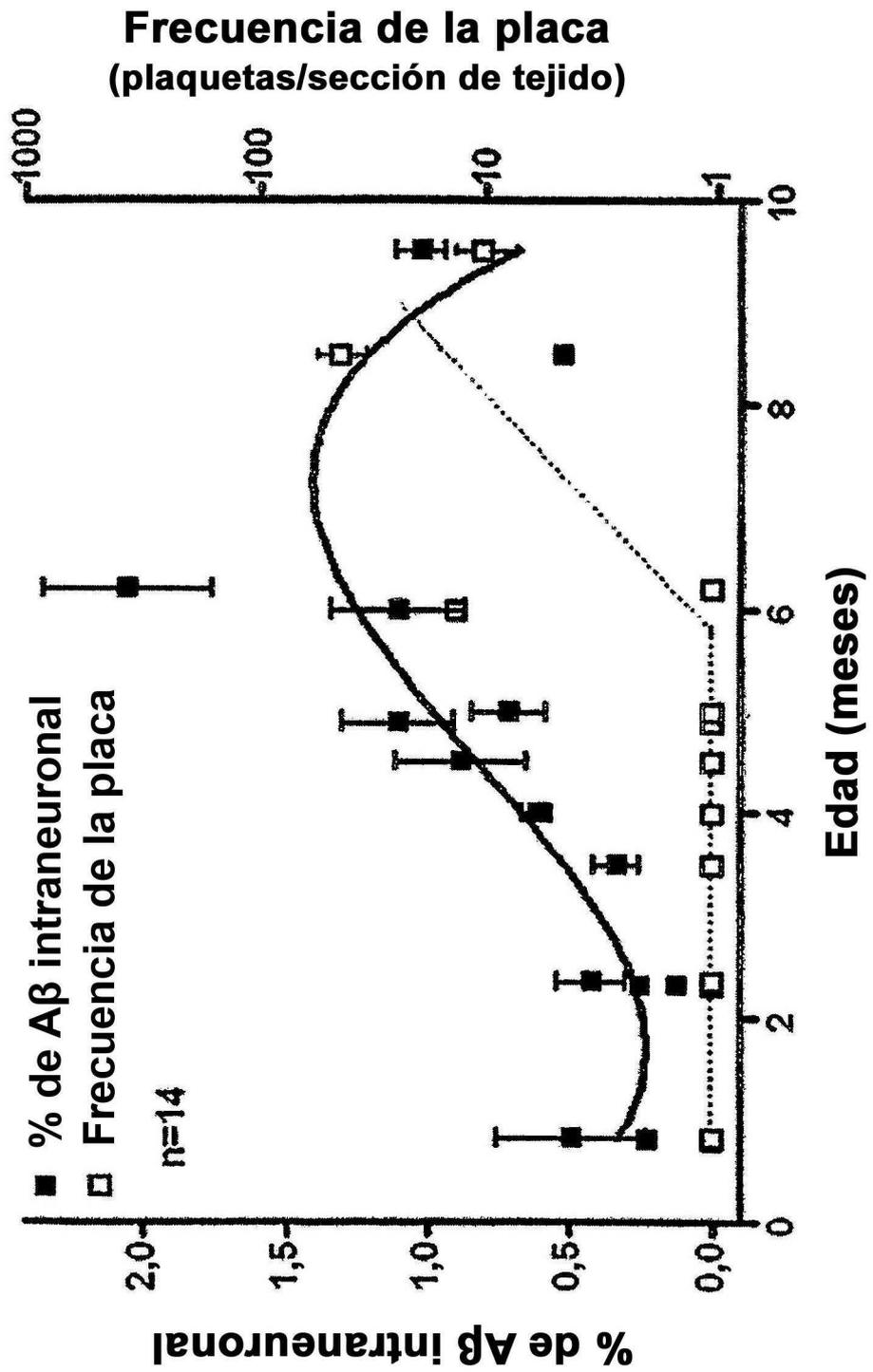


Fig. 9

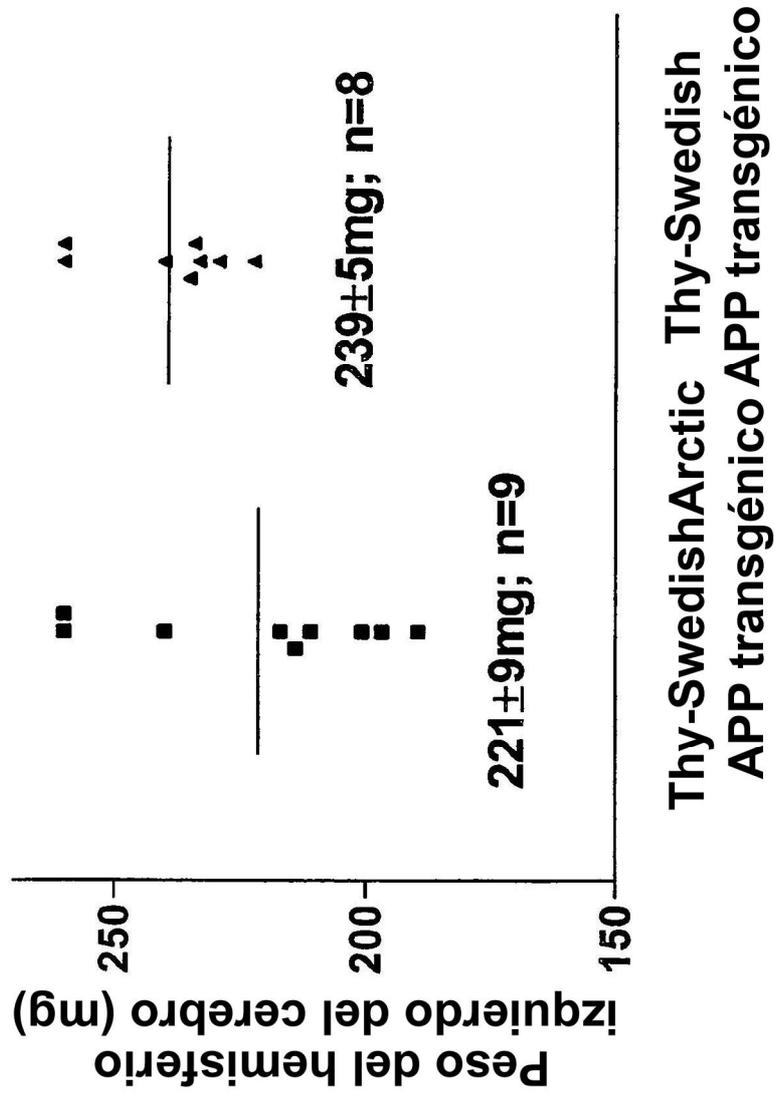
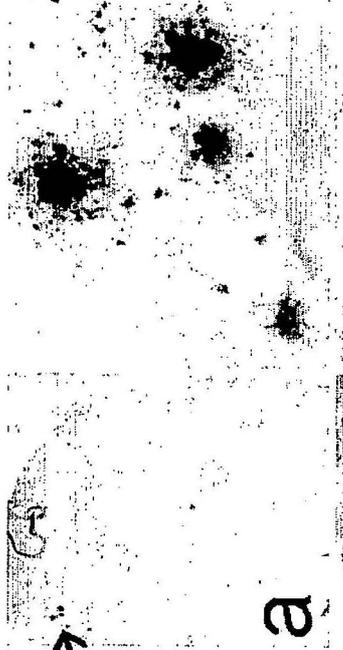


Fig. 10

Thy-SweArctic, 7 meses

→
Específicos
de A β 42



→
Específicos
de A β 40

