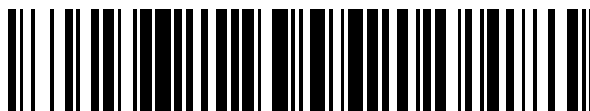


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 842**

51 Int. Cl.:  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 15/867** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08705168 .6**  
96 Fecha de presentación: **23.01.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2109361**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.2009**

54 Título: **Animal transgénico y método para su producción**

30 Prioridad:  
**25.01.2007 PL 38160507**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2012**

73 Titular/es:  
**INSTYTUT BIOLOGII DOSWIADCZALNEJ IM.M.  
NENCKIEGO PAN  
UL. PASTEURA 3  
02-093 WARSZAWA, PL**

72 Inventor/es:  
**KACZMAREK, Leszek;  
KONOPKA, Witold y  
DUNIEC, Kamila**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 379 842 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

Animal transgénico y método para su producción

El objeto de la presente invención es un mamífero transgénico, no humano, y un método para su obtención, que puede servir para producir una herramienta de investigación favorable.

5 Durante muchos años, animales, particularmente roedores de laboratorio tales como ratas y ratones, han compuesto modelos usados para estudiar los mecanismos de muchos procesos fisiológicos, así como la patogénesis de diversas enfermedades. La rata de laboratorio es un ejemplo particular, que ha sido el modelo de investigación líder en neurobiología, fisiología, farmacología, toxicología y muchas otras ciencias biomédicas durante más de 100 años. Con mucha frecuencia, el modelo preferido es un animal transgénico. La producción de mamíferos transgénicos se  
10 logró por primera vez en ratones. El método (tradicional) bien conocido para obtener mamíferos transgénicos, por ejemplo ratas, es una adaptación de métodos anteriores desarrollados para ratones y se basa en el aislamiento de óvulos fertilizados (embriones unicelulares) de oviductos femeninos tras superovulación inducida y copulación (Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., y Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) y el uso de métodos *in vitro* para  
15 introducir ADN foráneo en embriones unicelulares aislados. Posteriormente, los embriones modificados se mantienen hasta la fase bicelular y se introducen en los oviductos de madres sustitutas, que son hembras falsamente preñadas (descripción detallada de cada fase en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 18: *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, D. Murphy y A. Carter, Humana Press Inc., Totowa, NJ). Las madres sustitutas se obtienen usando la copulación con machos estériles (sometidos a vasectomía). El estado de la técnica está  
20 repleto de ejemplos de modelos transgénicos obtenidos usando el método descrito anteriormente o sus desarrollos.

La patente US5489742 reivindica un modelo de rata de artritis reumatoide. Se usó el método tradicional para obtener ratas transgénicas. Las líneas de ratas transgénicas son LEW y F344. Se provoca la superovulación mediante un goteo continuo de FSH (véase también: Armstrong, D. T. y Opavsky, M. A. (1988). *Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone*. *Biol. Reproduct.* 39, 511-518). Se transfirieron los embriones  
25 inmediatamente antes de la microinyección (fase unicelular). Se usaron hembras Sprague-Dawley que habían copulado con machos sometidos a vasectomía como madres sustitutas.

La descripción del documento EP0683226 describe sólo la transgénesis de ratones. Se empleó un procedimiento convencional usando hembras falsamente preñadas como madres sustitutas.

La solicitud WO9314200 describe un modelo animal de Alzheimer. Se describió la transgénesis tanto de ratas como de ratones. En el caso de ratones, la técnica se basa en la modificación de células madre embrionarias (ES). La transgénesis de las ratas se produce a lo largo de una ruta esencialmente tradicional. Para la transgénesis se usó la línea de rata Sprague-Dawley. Se provocó la superovulación mediante una única inyección subdérmica de PMSG sin el uso de GCh. Se transfirieron los embriones inmediatamente tras la microinyección. Se usaron hembras Sprague-Dawley falsamente preñadas como madres sustitutas. En el texto se describe un procedimiento para  
35 obtener ratas, pero parece evidente que sólo se obtuvieron ratones.

La descripción de la patente PL355353 revela un método mejorado para obtener ratas transgénicas usando microinyecciones de ADN en el pronúcleo del cigoto.

Los métodos mencionados anteriormente para introducir un sistema completo de expresión regulada en un animal usando transgénesis no es útil para el sistema nervioso central. Los sistemas citados actúan simultáneamente en varios tejidos, lo que significa que no son útiles en el estudio de los efectos locales de los genes introducidos, tal como su actividad en el cerebro. Por tanto, todavía existe una necesidad real de obtener animales transgénicos que tengan la capacidad de inducir la expresión local de un gen, particularmente en el tejido nervioso.

El problema indicado se ha solucionado inesperadamente en la presente invención.

El objeto de la presente invención es un animal no humano, transgénico que contiene:

45 (a) en todas las células diploides, una primera secuencia de ADN para la expresión de una proteína a partir de un gen bajo el control del promotor de tetraciclina (promotor de Tet); y

(b) en la circunvolución dentada del hipocampo, un segundo ADN que se ha introducido mediante inyección de un lentivirus que lo comprende en la circunvolución dentada del hipocampo, siendo dicho segundo ADN para la expresión del gen rTA bajo el control de un promotor específico para la circunvolución dentada del hipocampo, de modo que la expresión del rTA induce la expresión de la proteína codificada por la primera secuencia de ADN en su  
50 tejido diana.

El siguiente objeto de la presente invención es un método para obtener un animal no humano transgénico, caracterizado porque se introducen dos secuencias de ADN en las células del animal, en el que:

(a) se introduce el primer ADN en todas las células diploides del animal, siendo dicho primer ADN para la expresión

de una proteína a partir de un gen bajo el control del promotor de tetraciclina (promotor de Tet);

(b) se introduce el segundo ADN mediante inyección de un lentivirus que lo comprende en la circunvolución dentada del hipocampo del animal obtenido en (a), o de una progenie del mismo que lleva dicha primera secuencia de ADN; siendo dicho segundo ADN para la expresión del gen rTA bajo el control de un promotor específico para la circunvolución dentada del hipocampo.

Preferiblemente, la etapa de introducir el primer ADN implica microinyección de ADN en un pronúcleo cigótico.

Preferiblemente, dicho promotor específico para la circunvolución dentada es el promotor EF1alfa.

Preferiblemente, la proteína codificada por el primer ADN es EGFP.

La descripción de la presente invención se ha complementado con las siguientes figuras:

10 la figura 1 representa un esquema de un experimento que conduce a la expresión inducible de EGFP en la circunvolución dentada del hipocampo de rata, TetP-EGFP. (A) Ratas transgénicas TetP-EGFP/hip-LV-EF1a-rtTA-TetP-EGFP con el vector lentiviral LV-EF1a-rtTA introducido en la circunvolución dentada. DOX-doxiciclina (2 mg/ml) administrada en agua de bebida durante 14 días. (B) Sección transversal de un cerebro de rata a -3,14 del bregma (Paxinos y Watson, 1998). La flecha roja indica el sitio de inyección del vector lentiviral;

15 la figura 2 representa la expresión inducible del gen EGFP en la circunvolución dentada de una rata TetP-EGFP/hip-LV-EF1 $\alpha$ -rtTA. (A) Presenta imágenes de secciones transversales del cerebro de una rata TetP-EGFP tras la introducción del vector lentiviral LV-EF1 $\alpha$ -rtTA. Se les administró a las ratas doxiciclina (2mg/ml, 14 días) (panel inferior). El panel superior muestra secciones de tejido control (sin doxiciclina). (B) Una ampliación de la circunvolución dentada de ratas TetP-EGFP/hip-LV-EF1 $\alpha$ -rtTA (con doxiciclina) marcada en (A) (panel superior).  
20 Tinción fluorescente para el marcador neuronal NeuN y para las células de la astrogliá, GFAP (panel inferior). Se tiñeron las secciones con DAPI para visualizar los núcleos celulares.

### Ejemplo 1 – Obtención de ratas transgénicas

Con el fin de obtener ratas transgénicas, se usó un método mejorado de microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto descrito en la solicitud de patente PL355353 presentado ante la Oficina de Polaca Patentes (Kaczmarek *et al.*, 2002). Se usaron cepas de rata Wistar y Brown Norway (BN).

Con el fin de obtener un gran número de cigotos para la microinyección de ADN, se les administraron a ratas hembra Wistar de 5-6 semanas de edad 20 UI de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) con el fin de estimular los folículos ováricos. Tras 52 h, se administraron 35 UI de GCh (gonadotropina coriónica humana) con el fin de estimular la maduración y ovulación de los ovocitos. A continuación, las hembras se aparearon con machos Wistar maduros. Al día siguiente, se aislaron ovocitos fertilizados de los oviductos de hembras que tenían esperma en sus frotis vaginales. Se colocaron las células aisladas en una disolución de hialuronidasa (150 u/ml en PBS) con el fin de liberar las células foliculares que rodean el ovocito, que luego se transfirió en una gota de medio M2 a una placa de plástico en parafina líquida. Se incubaron los cigotos a 37,5°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se inyectaron constructos de ADN apropiados en uno de los pronúcleos cigóticos (habitualmente el más grande, proveniente del macho) en una gota de M2 usando una micropipeta de vidrio y un micromanipulador electromecánico bajo un microscopio. Se mantuvieron los embriones unicelulares inyectados en condiciones óptimas hasta el día siguiente (Hogan *et al.*, 1986; Murphy y Carter, 1993; Pinkert, 2002).

### Ejemplo 2 – Transferencia de embriones modificados

Se transfirieron los cigotos obtenidos en el ejemplo 2 que se habían desarrollado hasta la fase bicelular al día siguiente a los oviductos de ratas hembra Wistar como madres sustitutas de 8-12 semanas de edad el primer día de preñez. Se anestesiaron las hembras mediante una inyección intraperitoneal de xilazina y ketamina. Se afeitó una parte de la espalda de las ratas y luego se realizó una incisión en la piel y el peritoneo en la parte lateral trasera del cuerpo. Se transfirieron los embriones al infundíbulo del oviducto usando una pipeta de vidrio. Se implantaron a cada hembra aproximadamente 15 embriones. La transgénesis hizo uso de hembras preñadas, que se obtuvieron a través de la copulación un día anterior con ratas BN (marrones). La progenie entera de este cruce es marrón, mientras que los embriones inyectados (Wistar X Wistar) son blancos (Kaczmarek *et al.*, 2002). Entre la progenie nacida, sólo los individuos blancos son potencialmente transgénicos.

### Ejemplo 3 - Preparación de vectores lentivirales

Se produjo un vector lentiviral no replicativo, LV-EF1 $\alpha$ -rtTA, como resultado de transfectar una línea celular de riñón humano (HEK293T) con tres plásmidos de expresión distintos: (1) un plásmido de transferencia (pLV-EF1 $\alpha$ -rtTA), (2) un plásmido de empaquetamiento (p $\Delta$ 8.7) y (3) un plásmido que codifica para la glicoproteína de la cápside viral (pVSV-G). 48 horas tras la transfección de células 293T, se produjeron partículas virales y se liberaron en el medio, que se recogieron junto con el medio. A continuación, se centrifugó el medio a 1500 rpm, con el fin de deshacerse de contaminantes celulares. Se recogió el medio con los vectores y se incubó con ADNasa a 37°C durante 15 min.,

5 tras lo cual se filtraron las preparaciones resultantes a través de filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  y se concentraron a través de ultracentrifugación (1,5 horas; 22000 rpm; 4°C). A continuación, se suspendió en PBS el precipitado que contenía los vectores lentivirales y se congeló en alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  a -80°C. Se estimó el título del vector lentiviral LV-EF1 $\alpha$ -rtTA usando PCR en tiempo real y cebadores que reconocen la secuencia de ADN corta en el genoma del vector.

#### Ejemplo 4 - Inyección *in vivo* del vector

10 Se realizaron las inyecciones estereotácticas de los vectores lentivirales (LV-EF1 $\alpha$ -rtTA) en ratas transgénicas TR-GFP macho. Se anestesiaron las ratas con una mezcla de xilazina y ketamina. Se inyectó el vector viral: LV-EF1 $\alpha$ -rtTA (3  $\mu\text{l}$ ;  $1,5 \times 10^7$  partículas de vector lentiviral) en la circunvolución dentada (Paxinos y Watson, 1998) usando un microinyector Hamilton a una velocidad de 0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

#### Ejemplo 5 – Expresión local en la rata transgénica del ejemplo 4

15 Las ratas transgénicas obtenidas en los ejemplos 1-4 tenían el gen EGFP en su genoma, bajo el control de un promotor de tetraciclina. Era necesaria la inclusión del promotor de tetraciclina para inducir el promotor TetP usando doxiciclina. Se usó el vector de lentivirus con el fin de introducirlo en una estructura cerebral seleccionada. Se usó el vector lentiviral para introducir el gen rtTA en una estructura seleccionada, la circunvolución dentada del hipocampo de ratas TetP-EGFP (figura 1). Se les administró a tales ratas modificadas doxiciclina (2 mg/ml) en su agua de bebida durante 14 días (figura 1). A continuación, se sacrificaron las ratas y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Se determinó la presencia de la proteína EGFP verde usando un microscopio fluorescente. Se observó la expresión de EGFP sólo en la circunvolución dentada del hipocampo, en el sitio de inyección del vector lentiviral en ratas a las que se les administró doxiciclina (figura 2a). Las células que mostraban presencia de EGFP tenían protuberancias características de las neuronas, y se aparecían en combinación con los cuerpos de células granulosas de la circunvolución dentada. Se confirmaron sus características neuronales usando un marcador para neuronas, NeuN. No se observó localización conjunta de la fluorescencia de EGFP con el marcador de la astrogliá GFAP (figura 2b). En las ratas control (sin doxiciclina), no se observó expresión de EGFP.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Animal no humano, transgénico que contiene:
  - (a) en todas las células diploides, una primera secuencia de ADN para la expresión de una proteína a partir de un gen bajo el control del promotor de tetraciclina (promotor de Tet); y
  - 5 (b) en la circunvolución dentada del hipocampo, un segundo ADN que se ha introducido mediante inyección de un lentivirus que lo comprende en la circunvolución dentada del hipocampo, siendo dicho segundo ADN para la expresión del gen rTA bajo el control de un promotor específico para la circunvolución dentada del hipocampo, de modo que la expresión del rTA induce la expresión de la proteína codificada por la primera secuencia de ADN en este tejido diana.
- 10 2. Método para obtener un animal no humano transgénico, caracterizado porque se introducen dos secuencias de ADN en las células del animal, en el que:
  - (a) se introduce el primer ADN en todas las células diploides del animal, siendo dicho primer ADN para la expresión de una proteína a partir de un gen bajo el control del promotor de tetraciclina (promotor de Tet);
  - 15 (b) se introduce el segundo ADN mediante inyección de un lentivirus que lo comprende en la circunvolución dentada del hipocampo del animal obtenido en (a), o de una progenie del mismo que lleva dicha primera secuencia de ADN; siendo dicho segundo ADN para la expresión del gen rTA bajo el control de un promotor específico para la circunvolución dentada del hipocampo.
3. Animal de la reivindicación 1 o método de la reivindicación 2, en el que la etapa de introducir el primer ADN implica microinyección de ADN en un pronúcleo cigótico.
- 20 4. Animal de la reivindicación 1 o método de la reivindicación 2, en el que dicho promotor específico para la circunvolución dentada es el promotor EF1alfa.
5. Animal de la reivindicación 1 o método de la reivindicación 2, en el que la proteína codificada por el primer ADN es EGFP.

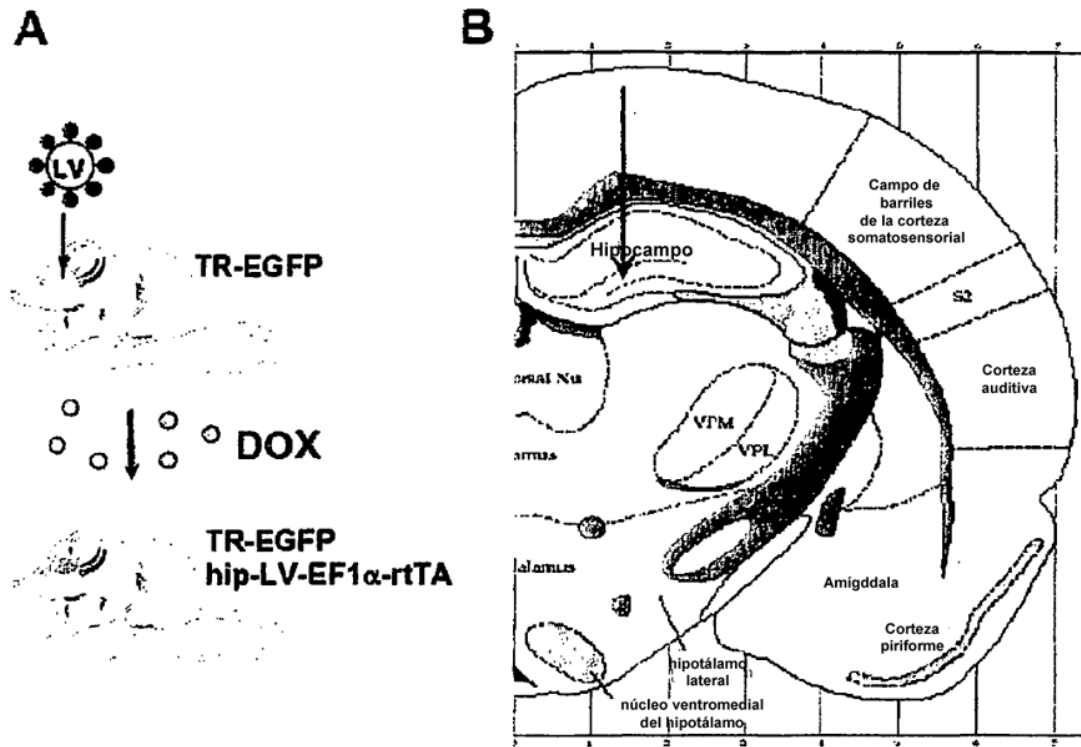
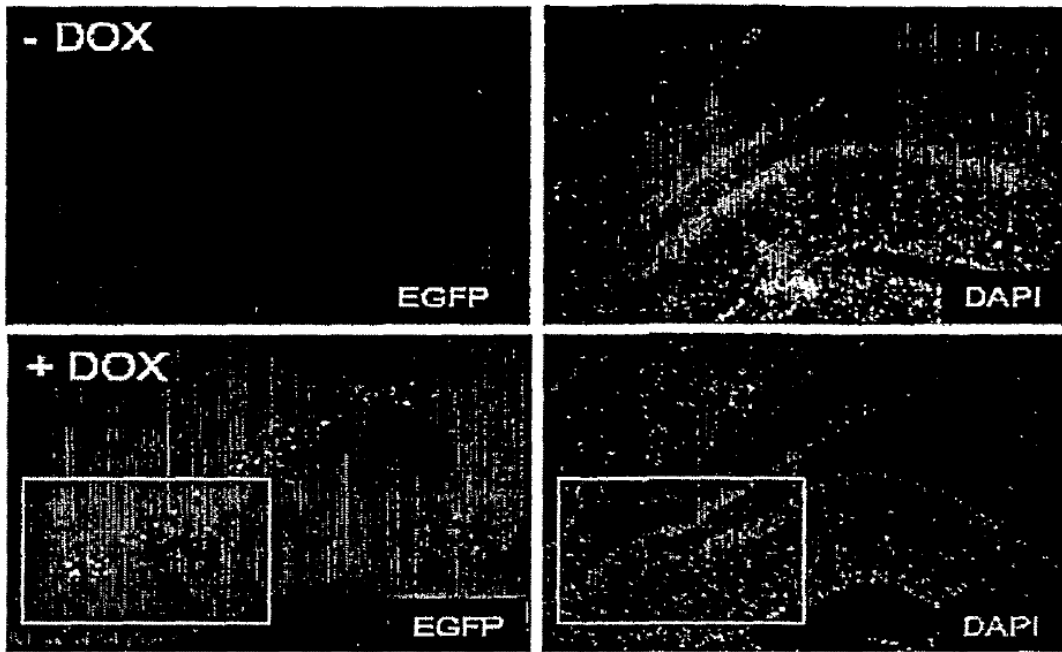
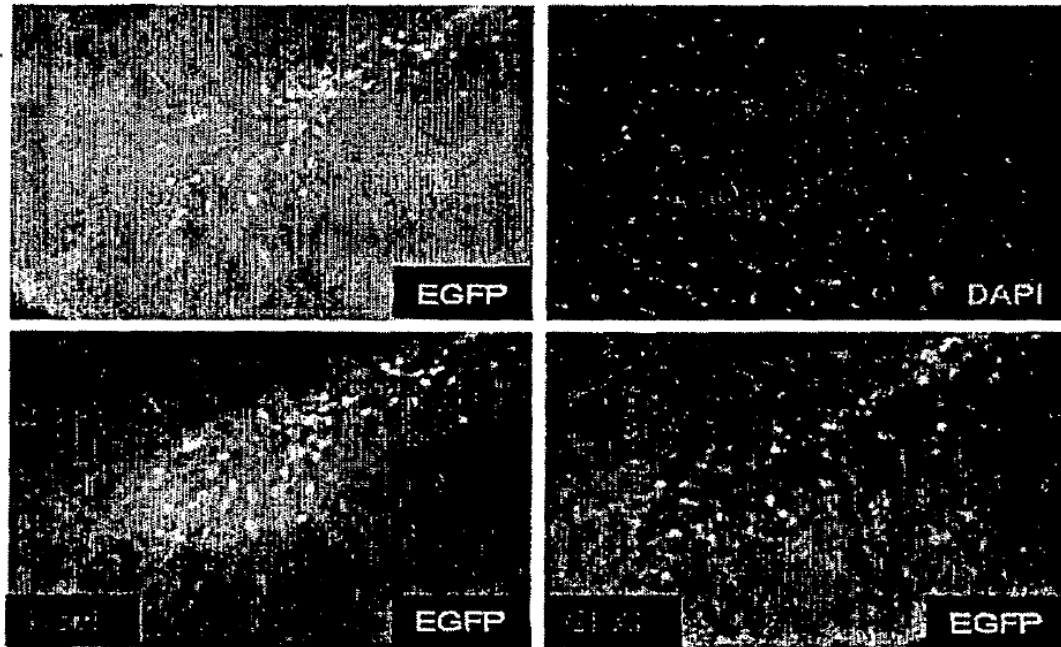


Fig. 1

**A**



**B**



**Fig. 2**