

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 076**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04782554 .2**
96 Fecha de presentación: **27.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1670308**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54 Título: **Modelos de cáncer quimérico**

30 Prioridad:
28.08.2003 US 499277 P
07.11.2003 US 518249 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
AVEO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
75 SIDNEY STREET, 4TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
HEYER, JOERG;
ROBINSON, MURRAY, O.;
RIDEOUT, WILLIAM, III;
DEPINHO, RONALD A.;
CLARK, STEVEN, C.;
ZHOU, YINGHUI;
JACKS, TYLER y
O'HAGAN, RONAN

74 Agente/Representante:
ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 390 076 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

Modelos quiméricos de cáncer

5 Antecedentes de la invención

Las tecnologías transgénicas y de knockout han hecho posible la simulación de mutaciones genéticas humanas en animales de laboratorio tales como ratones. Sin embargo, es un procedimiento que consume tiempo generar modelos de enfermedad complejos que contengan múltiples mutaciones genéticas debido a la necesidad de emparejar diversas cepas animales para obtener las combinaciones de alelos deseadas en un animal no humano. Existe la necesidad de producción rápida de animales no humanos que alberguen múltiples mutaciones genéticas en un número sustancial de sus células y de este modo que sean propensos a enfermedades tales como cáncer.

15 Descripción resumida de la invención

Se ha descubierto que es posible realizar más de dos alteraciones genéticas en una célula madre embrionaria de mamífero no humano (ES) manteniendo a la vez la pluripotencialidad de la célula ES. Además, se ha descubierto que cuando se inyectan células madre embrionarias no humanas que contienen un oncogén recombinante en un embrión no humano de etapa temprana, el mamífero no humano quimérico resultante es un modelo de cáncer *in vivo* útil. Tales animales no humanos quiméricos proporcionan ciertas ventajas frente a animales transgénicos no humanos convencionales que contienen la misma o las mismas modificaciones genéticas presentes en las células modificadas genéticamente de dicho animal quimérico.

La invención proporciona un método para preparar un modelo de cáncer de ratón quimérico, que comprende:

- a) proporcionar una célula ES de ratón que comprende una mutación que suprime o inactiva un gen supresor de tumores,
- b) transfectar la célula ES con
 - (i) un primer vector que comprende un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible que incluye un elemento de respuesta cuya actividad depende de un transactivador, y
 - (ii) un segundo vector que codifica el gen transactivador unido operativamente a un promotor específico de tejido,
- c) inyectar la célula ES en un embrión de ratón, y
- d) transferir el embrión a una madre sustituta de ratón.

Se describe en la presente memoria un mamífero no humano quimérico, algunas de cuyas células, pero no todas de cuyas células, contienen un oncogén recombinante. El oncogén recombinante, por ejemplo, un oncogén activado, se une operativamente a un promotor inducible. Las células que contienen un oncogén recombinante también contienen una mutación genética que provoca que el mamífero no humano tenga mayor susceptibilidad a cáncer que un mamífero no humano que no contiene la mutación genética. El mamífero no humano es un ratón.

Los ejemplos de oncogenes recombinantes útiles en el método de la invención incluyen HER2, K-RS y EGFR. La mutación genética útil para provocar que el ratón tenga una susceptibilidad aumentada a cáncer es una mutación que suprime o inactiva un gen supresor de tumores. Los ejemplos de genes supresores de tumores que pueden suprimirse o inactivarse en el método de la invención son *Ink4a*, P53 y PTEN. De acuerdo con la invención, el promotor inducible incluye un elemento de respuesta cuya actividad depende de un transactivador codificado por un gen transactivador unido operativamente a un promotor específico de tejido. Un ejemplo de un promotor inducible tal es un promotor TetO (operador de tetraciclina).

También se describe en la presente memoria una célula ES murina que contiene un genoma que comprende un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible; y una mutación genética que provoca que un ratón que contiene células que descienden de la célula ES tenga mayor susceptibilidad a cáncer que un ratón que no contiene células que descienden de la célula ES. La célula ES es una célula ES de ratón.

Se describe en la presente memoria un método para obtener un mamífero no humano quimérico, algunas de cuyas células, pero no todas de cuyas células, contienen un genoma que comprende: (a) un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible, y (b) una mutación genética que provoca que el mamífero tenga mayor susceptibilidad a cáncer que un mamífero que no contiene la mutación genética. El método de acuerdo con la invención incluye: (a) proporcionar una célula ES de ratón que contiene un genoma que comprende un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible; y una mutación genética que provoca que un ratón que contiene células que descienden de la célula ES tenga mayor susceptibilidad a cáncer que un ratón que no contiene células que descienden de la célula ES; (b) introducir la célula ES en un embrión de ratón hospedador, por ejemplo

por inyección, produciendo de este modo un embrión manipulado y (c) implantar el embrión manipulado en una madre sustituta.

5 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se describen posteriormente métodos y materiales ilustrativos, aunque también pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En toda la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” implican la inclusión de un número entero indicado o grupo de números enteros pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Otras características y ventajas de la invención se describen en la siguiente descripción detallada.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de datos que muestran la regresión de dos tumores de un ratón de modelo Her2 de mama (ratón N° 259) después de retirada de doxiciclina del agua para beber. Los cuadrados representan el tumor que surge en la cuarta glándula mamaria izquierda. Los círculos representan el tumor que surge en la cuarta glándula mamaria derecha. El ratón ha estado tomando doxiciclina durante 6 semanas. El día 1 representa la primera medición de los tumores. Después de medir el tamaño del tumor, se retiró doxiciclina del agua para beber. Los tumores se midieron cada día durante 2 semanas. La retirada de doxiciclina dio como resultado regresión completa de los tumores.

25 La Figura 2 es un gráfico de datos que muestra la regresión de dos tumores de un ratón de modelo Her2 de mama (ratón N° 331) después de retirada de doxiciclina del agua para beber. Los cuadrados representan el tumor que surgió en la cuarta glándula mamaria derecha. Los círculos representan el tumor que surgió en la cuarta glándula mamaria izquierda. El ratón estuvo tomando doxiciclina durante 7 semanas. El día 1 representa la primera medición de los tumores. El día 7, después de medir el tamaño del tumor, se retiró doxiciclina del agua. Los tumores se midieron cada día durante 23 días. La retirada de doxiciclina dio como resultado regresión completa de un tumor y la regresión casi completa del otro tumor durante el periodo de estudio.

Descripción detallada de la invención

35 Se describen en la presente memoria métodos para estudiar el papel de una proteína dada en el desarrollo de enfermedad (por ejemplo, desarrollo de tumores), la oncogenicidad dependiente de contexto de una mutación genética, la toxicidad de una proteína dada en el desarrollo de órganos (incluyendo supervivencia). Las células útiles en estos métodos son, por ejemplo, células ES no humanas que tienen más de dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) alteraciones genéticas recombinantes (es decir, de origen no natural) en sus genomas. También se describe en la presente memoria un mamífero no humano quimérico algunas de cuyas células difieren genéticamente de otras células en el mamífero y derivan de tales células ES. Este animal no humano se produce a partir de un embrión de etapa temprana multicelular, por ejemplo, un blastocisto, en el que se inyectan las células ES no humanas. Dicho animal quimérico puede ser propenso a enfermedad y puede desarrollar una enfermedad tal como cáncer. Cuando las células ES y el blastocisto en el que se inyectan derivan de la misma cepa animal no humana, el mamífero no humano quimérico también se llama mamífero mosaico. Además del método de inyección de células ES anterior, también puede desarrollarse un animal no humano mosaico a partir de un embrión que se ha infectado con construcciones virales que contienen los elementos genéticos deseados.

La invención proporciona un método para preparar un modelo de cáncer de ratón quimérico, que comprende:

- 50 a) proporcionar una célula ES de ratón que comprende una mutación que suprime o inactiva un gen supresor de tumores,
- b) transfectar la célula ES con
 - 55 (i) un primer vector que comprende un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible que incluye un elemento de respuesta cuya actividad depende de un transactivador, y
 - (ii) un segundo vector que codifica el gen transactivador unido operativamente a un promotor específico de tejido,
- c) inyectar la célula ES en un embrión de ratón, y
- d) transferir el embrión a una madre sustituta de ratón.

60 Preservando a la vez el mismo diseño genético que un modelo transgénico de línea germinal, el modelo quimérico obtenido por el método de la presente invención proporciona nuevas ventajas para estudiar enfermedades que implican múltiples genes. La técnica anterior abarca el mismo problema usando vectores retrovirales aviares para

introducir múltiples transgenes (Fisher *et al.*, Oncogene 18: 5253-5260 (1999)), o analiza múltiples etapas de reproducción para obtener un modelo de enfermedad similar (Cichowski *et al.*, Science 286: 2172-2176 (1999). Como alternativa a estas múltiples etapas de reproducción, el uso de vectores lentivirales o complementación de embrión tetraploide se mencionan en una revisión publicada en 2002 (Jackson-Grusby *et al.*, Oncogene 21: 5504-5514 (2002)). El modelo quimérico como se ha descrito ha mejorado significativamente la velocidad y flexibilidad del desarrollo del modelo de enfermedad. Por ejemplo, para generar un modelo de melanoma transgénico descrito en Chin *et al.*, Nature 400: 468-472 (1999), habría que criar tres líneas animales con cuatro alteraciones genéticas respectivas, una mutación nula INK4a homocigota (es decir, mutaciones nulas en ambos alelos de INK4a), un transgén Tyr-rtTA, y un tetO-H-ras, para obtener un animal transgénico con las cuatro alteraciones genéticas. Esto requiere una gran cantidad de tiempo. Por el contrario, un modelo de melanoma quimérico obtenido por el método de la presente invención no requiere reproducción. Solo hace falta establecer células ES de ratón con las cuatro alteraciones genéticas e inyectarlas en un blastocisto, que se desarrolla a un ratón intacto tras trasplante al útero de una madre sustituta. El tiempo medio ahorrado puede ser hasta de un año. Para establecer modelos de ratón para una enfermedad diferente, sólo se necesita introducir en células ES diferentes conjuntos o combinaciones de mutaciones genéticas.

El modelo quimérico obtenido por el método de la presente invención permite adicionalmente el estudio de genes importantes en el desarrollo temprano, debido a que el modelo quimérico proporciona correlación cualitativa entre el grado de quimerismo y la viabilidad de los ratones. El modelo quimérico también proporciona un vehículo para ensayar compuestos terapéuticos anti-neoplásicos.

La presente invención ha superado un obstáculo importante en la tecnología de células ES. Antes de la presente invención, se creía ampliamente que las células ES sometidas a más dos alteraciones genéticas a través de tecnología de ADN recombinante eran propensas a diferenciación y pérdida de pluripotencialidad.

I. Células ES alteradas genéticamente

Una línea celular ES no humana descrita en la presente memoria contiene más de dos alteraciones genéticas recombinantes en su genoma. La línea celular ES no humana puede establecerse introduciendo más de dos construcciones de ácido nucleico en una célula ES simultánea o secuencialmente, pudiendo contener cada construcción uno o más elementos genéticos que provocarán alteraciones genéticas del genoma hospedador. Estos elementos genéticos también pueden insertarse en un vector sencillo, por ejemplo, un vector BAC, PAC, YAC o MAC.

Los elementos genéticos ilustrativos incluyen oncogenes, construcciones de interferencia de ARN, genes marcadores seleccionables (por ejemplo, genes marcadores de selección de fármacos y genes que codifican proteínas fluorescentes o luminiscentes) y construcciones knockout que se dirigen a un gen endógeno que previene enfermedad (por ejemplo, genes supresores de tumores). Puede incorporarse un elemento genético deseado en el genoma de forma aleatoria o en una localización diana.

Las alteraciones genéticas diana pueden introducir un cambio deseado en una localización específica en un gen endógeno implicado en una enfermedad genética, tal como enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, el gen APP en la enfermedad de Alzheimer y el gen SOD-1 en la enfermedad de Lou Gehrig), enfermedades cardíacas (por ejemplo, el gen TBX-1 o -5 en enfermedades cardíacas y Síndrome Velo-Cardio-Facial), diabetes (por ejemplo, el gen AKT en Tipo II) y enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de los cambios incluyen una mutación nula (knock out) para un gen supresor de tumores o una mutación de activación (knock in) para un oncogén celular. Por ejemplo, se puede reemplazar una región codificante o reguladora de un gen supresor de tumores con un gen marcador seleccionable flanqueado por un par de sitios LoxP; insertar una mutación negativa dominante en un gen supresor de tumores; reemplazar el promotor nativo de un oncogén celular con un promotor constitutivo o inducible, o insertar una mutación de activación en un oncogén celular (véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, Nature 410: 1111-6 (2001)). Una alteración genética tal puede conseguirse por recombinación homóloga. En una construcción de ácido nucleico usada para recombinación homóloga, la alteración genética para introducir en el genoma hospedador está flanqueada por secuencias homólogas de la región genómica diana.

Los oncogenes útiles en el establecimiento del modelo de enfermedad quimérica de acuerdo con el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, los que codifican K-RAS, H-RAS, N-RAS, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MDM2, TGF- β , RhoC, miembros de la familia de AKT, myc (por ejemplo, c-myc), β -catenina, PDGF, C-MET, PI3K-CA, CDK4, ciclina B1, ciclina D1, gen del receptor de estrógenos, gen del receptor de progesterona, Her2 (también conocido como neu o ErbB2), otros genes ErbB (incluyendo ErbB1, ErbB3 y ErbB4), genes en la rutas de transducción de señales MAPK y PI3K-AKT, TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt y miembros de la familia anti apoptótica Bcl2 (por ejemplo, Bcl2) así como sus formas activadas y proteínas virales

tales como antígenos PyV MT y SV40 T. También pueden usarse mutaciones de activación de estos oncogenes (por ejemplo, Her2V664E, K-RasG12D y β -catenina Δ 131).

Los genes supresores de tumores cuya inactivación es útil en el establecimiento del modelo de enfermedad quimérica de acuerdo con el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Apaf1, Caspasa 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2 o NKX3.1. Otros ejemplos de genes supresores de tumores son los implicados en la reparación de daño de ADN (por ejemplo, ATM, CHK2, ATR, BRCA2, MSH2, MSH6, PMS2, Ku70, Ku80, ADN/PAK, XRCC4 o MLH1), y señalización y diferenciación celular (por ejemplo, Neurofibromatosis de Tipo 1, Neurofibromatosis de Tipo 2, Poliposis Adenomatosa del Colón, la proteína supresora de tumores de Wilms, Patched o FHIT). Además de la mutación diana, los genes supresores de tumores (o cualquier otro gen que prevenga enfermedad) pueden inactivarse por un ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi) o agente de ribozima expresado a partir de una construcción integrada de forma estable en el genoma hospedador.

De acuerdo con el método de la presente invención, el modelo de enfermedad quimérica se desarrolla a partir de células ES de ratón que contienen un oncogén activo introducido así como uno o más genes supresores de tumores endógenos inactivados. Por ejemplo, las células ES pueden contener alteraciones genéticas que dan como resultado la expresión de una forma activada de EGFR (designada como EGFR*) en combinación con expresión reducida de p16^{INK4a} o p19^{ARF} (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo EGFR*⁺ e INK4a/ARF^{-/-}); alteraciones genéticas que dan como resultado expresión de PDGF en combinación con expresión de p53 reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo PDGF⁺ y p53^{-/-}); alteraciones genéticas que dan como resultado expresión de TGF- α en combinación con expresión de p53 reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo TGF- α ⁺ y p53^{-/-}); y alteraciones genéticas que dan como resultado expresión de PTEN reducida y expresión de p16^{INK4a} o p19^{ARF} reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo PTEN^{-/-} e INK4a/ARF^{-/-}).

Un ejemplo de conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de pulmón es TetO-EGFR* CCSP-rTA, p53^{-/-}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina (marcador de resistencia a antibióticos seleccionable). Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de colon es TetO-K-RAS, vilina-rTA, APC^{-/-}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de glioblastoma es TetO-EGFR*, Nestina-rTA, p53^{-/-}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de próstata es TetO-AKT1, probasina-rTA, Rb^{-/-}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de hígado es TetO- β catenina, ApoE-rTA, NF1^{-/-}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina.

Pueden usarse diversos vectores para preparar las construcciones de ácido nucleico para su uso en el método de la presente invención. Estos vectores pueden basarse en plásmidos o virus tales como retrovirus, adenovirus y lentivirus. Los vectores pueden introducirse en células ES de ratón mediante una diversidad de métodos, incluyendo pero sin limitación, fusión celular (por ejemplo, fusión de esferoplastos), fusión de liposomas (transposomas), métodos de transfección de ácido nucleico convencionales (tales como precipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección) e infección por vectores virales. Puede usarse una diversidad de métodos para explorar con respecto a células ES de ratón que han incorporado de forma estable las alteraciones genéticas deseadas. Tales métodos incluyen, sin limitación, detección de resistencia a fármacos cuando se introduce conjuntamente un gen marcador de selección de fármacos (por ejemplo, un gen resistente a neomicina, un gen resistente a puromicina, o un gen resistente a higromicina); detección de emisión de fluorescencia/bioluminiscencia cuando se introduce conjuntamente un gen marcador fluorescente/bioluminiscente (por ejemplo, un gen que codifica una proteína verde, amarilla, azul o roja fluorescente, y genes de luciferasa); reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"); y análisis de transferencia de Southern.

Las células ES de ratón pueden alterarse genéticamente para contener una secuencia de ácido nucleico que se regula de una manera inducible. Por ejemplo, una secuencia de oncogén o de ARN de interferencia introducida puede situarse bajo el control de un promotor inducible tal como el sistema de promotor regulado por tetraciclina descrito por ejemplo en el documento WO 01/09308. En este caso, la administración del agente inductor (por ejemplo, tetraciclina o doxiciclina) mediante alimento o agua para beber a un animal quimérico, en el que al menos algunas células proceden de estas células ES de ratón alteradas genéticamente, puede dar como resultado la expresión del oncogén o producto de ARNi. Otros promotores inducibles incluyen, sin limitación, un promotor de metalotioneína, el sistema promotor IPTG/lacI, el sistema promotor de ecdisona y el sistema "lox parada lox" para suprimir de forma irreversible secuencias inhibitorias para traducción o transcripción. En vez de promotores inducibles, la expresión de un gen que provoca enfermedad también puede activarse o desactivarse de forma inducible fusionando el producto polipeptídico del gen con, por ejemplo, una secuencia polipeptídica del receptor de estrógenos, cuando la administración de estrógeno o un análogo de estrógeno (por ejemplo, hidroxitamoxifeno) permitirá el plegamiento correcto del polipéptido en una proteína funcional.

5 La secuencia que codifica ARN de interferencia o que codifica polipéptido introducida también puede situarse bajo un promotor constitutivamente activo general, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), EF1 α , LTR retrovirales y región de SV40 temprana. Como alternativa, la secuencia codificante puede colocarse bajo el control de un promotor específico de tejido, tal como un promotor de tirosinasa o un promotor de TRP2 en el caso de células de melanoma y melanocitos; un promotor MMTV o WAP en el que caso de células de mama y/o cánceres; un promotor de Vilina o FABP en el caso de células intestinales y/o cánceres; un promotor de PDX en el caso de células pancreáticas; un promotor RIP en el caso de células beta pancreáticas; un promotor de Queratina en el caso de queratinocitos; un promotor de Probasina en el caso de epitelio prostático; un promotor de Nestina o GFAP en el caso de células y/o cánceres del sistema nervioso central (SNC); una Tirosina Hidroxilasa, promotor S100 o promotor de neurofilamentos en el caso de neuronas; el promotor específico de páncreas descrito en Edlund *et al.*, Science 230: 912-916 (1985); un promotor de proteína secretora de células de Clara en el caso de cáncer de pulmón; y un promotor de miosina Alfa en el caso de células cardiacas.

15 También pueden seleccionarse promotores regulados por el desarrollo. Estos incluyen, sin limitación, los promotores hox murinos (Kessel y Gruss, Science 249: 374-379 (1990)) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman, Genes Dev. 3: 537-546 (1989)).

20 Puede usarse cualquier línea celular ES de ratón que proporcione quimerismo adecuado en la presente invención. Las líneas celulares incluyen, sin limitación, E14.1, WW6, CCE, J1 y AB1. Véase también Alex Joyner, Ed., Gene Targeting, A Practical Approach, Capítulo 4 (Virginia Papaioannou), Oxford Press, 2^a Ed., (2000). En algunas realizaciones, las líneas celulares ES proporcionan 10% o mayor quimerismo. En algunas realizaciones, las líneas celulares ES proporcionan 90% o mayor quimerismo.

25 II. ANIMALES NO HUMANOS QUIMÉRICOS

30 Como se usa en la presente memoria "quimérico" significa quimérico con respecto a ontogenia. En consecuencia, un mamífero no humano quimérico es un animal que ha crecido, es decir, se ha desarrollado, directamente a partir de un embrión multicelular en el que se ha inyectado o agregado al menos una célula ES no humana modificada genéticamente. Un ratón quimérico obtenido por el método de la invención debe distinguirse de un ratón desarrollado morfológicamente que ha recibido un xenoinjerto, por ejemplo, un injerto de órgano, un injerto de tejido o un injerto de tumor de otro ratón.

35 Como se usa en la presente memoria, "mamífero no humano" significa cualquier mamífero distinto de un ser humano, por ejemplo una rata, un ratón, un hámster o una cobaya.

40 Puede generarse un mamífero no humano quimérico introduciendo células ES no humanas en un embrión hospedador. Esto puede realizarse, por ejemplo, por inyección de blastocistos o agregación con embriones pre-implantación de etapa más temprana (por ejemplo, embrión de ocho células). El embrión se transfiere posteriormente a una madre sustituta para gestación. El quimerismo en el animal no humano nacido puede determinarse por fenotipo (tal como color del pelaje, si el embrión hospedador y las células ES derivan de cepas animales de diferentes colores de pelaje), PCR, análisis de transferencia de Southern, o análisis bioquímico o molecular de genes polimórficos (tales como glucosa fosfato isomerasa). Para facilitar la identificación de animales no humanos quiméricos que tienen una alteración genética deseada, se puede introducir conjuntamente un gen indicador detectable y la alteración genética deseada en las células ES no humanas. Los genes indicadores ilustrativos incluyen los que codifican una proteína fluorescente tal como una proteína verde fluorescente, una proteína amarilla fluorescente, una proteína azul fluorescente o una proteína luminiscente tal como luciferasa o β -galactosidasa.

50 Para aumentar la contribución de células ES no humanas introducidas en un tejido específico, se puede usar un embrión no humano hospedador que sea deficiente en la generación de ese tejido. Esto puede conseguirse por cualquier método adecuado, incluyendo expresión inducible de un gen de toxina, por ejemplo, toxina diftérica, en un tipo celular específico, o delección específica de tejido de genes necesarios para generar este tipo celular. En un sistema de complementación tal, todas o la mayoría de las células del tipo celular o tejido deseado derivarán de las células ES introducidas.

60 Los mamíferos no humanos pueden ser inmunocomprometidos o inmunodeficientes. Pueden desarrollarse enfermedades más temprano y/o más rápido en tales animales. Para desarrollar tales animales, se pueden usar blastocistos derivados de, por ejemplo, un animal SCID ligado a X, o un animal RAG1 $^{-/-}$ o RAG2 $^{-/-}$.

Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la presente invención proporcionan modelos eficaces para desarrollar enfermedades que se originan a partir de células ES introducidas. En un modelo de cáncer inducible

obtenido por el método de la presente invención, el ratón puede desarrollar cáncer en un intervalo de unos pocos meses desde la inducción de la expresión del oncogén. El ratón también puede tratarse con carcinógenos, por ejemplo, 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno o ENU, para facilitar este procedimiento.

5 Los modelos de ratón quiméricos obtenidos por el método de la presente invención proporcionan flexibilidad en el desarrollo de modelos de diferentes enfermedades. Por ejemplo para su uso en un método de acuerdo con la invención pueden establecerse líneas celulares ES murinas para diferentes modelos de cáncer suprimiendo un gen supresor de tumores (por ejemplo, p53) e introduciendo un gen indicador (por ejemplo, luciferasa), un gen transactivador de tetraciclina inversa específica de tejido (es decir, MMTV-rtTA) y un oncogén de elección (por ejemplo, Akt, Her2V664E, Her2, Bcl2, K-Ras y Ciclina D1) bajo el control de un promotor regulado por transactivador de tetraciclina inversa (rtTA). Estos modelos de cáncer permiten el estudio de comparación de cánceres de diferente etiología, y estudio de comparación de diferentes oncogenes en el desarrollo de cáncer.

15 III. Usos ilustrativos

Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la presente invención y células enfermas derivadas de los ratones pueden usarse para delinear el inicio, progresión, mantenimiento, regresión, enfermedad residual mínima, recurrencia o cualquier otro estadio del desarrollo de una enfermedad específica tal como un cáncer. También pueden usarse para identificación de diana farmacológica, validación de diana y ensayo de eficacia durante el desarrollo de fármacos.

20 A. Identificación de Nuevos Genes Relacionados con Cáncer

Los modelos de cáncer quiméricos obtenidos por el método de la presente invención pueden usarse para examinar la oncogenicidad de cualquier gen, y para identificar nuevos genes relacionados con cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse conjuntamente un oncogén candidato y una mutación nula de un gen supresor de tumores endógenos (o una construcción de ARNi que se dirige al gen supresor de tumores) en células ES. Una tasa de incidencia más alta, o latencia más corta, de cáncer, que se origina a partir de las células ES en un ratón quimérico resultante en comparación con el que se origina de células ES que contiene solamente la mutación nula en un ratón de control, indica que el gen de candidato es un oncogén.

Además, puede establecerse un perfil de expresión génica para un ratón quimérico que tenga cáncer debido a la expresión de un oncogén introducido mediante células ES. Después, pueden realizarse comparaciones de perfiles de expresión de genes en diferentes estadios del desarrollo de cáncer para identificar genes cuyos patrones de expresión están alterados. Las técnicas usadas para establecer perfiles de expresión génica incluyen el uso de sustracción de supresión (en cultivo celular), presentación diferencial, análisis proteómico, análisis seriado de expresión génica (SAGE) e hibridación genómica comparativa (CGH). Para permitir la realización de un perfil de alto rendimiento pueden usarse micromatrices de oligonucleótidos y/o ADNc.

40 Pueden compararse perfiles de expresión génica en modelos de ratón separados que contienen diferentes alteraciones genéticas que los predisponen al mismo tipo de cáncer para identificar genes identificados con tumor. Por ejemplo, la sobreexpresión de uno cualquiera de Akt, Her2, Bcl-2, K-Ras y Ciclina D1, o mutaciones de activación de cualquiera de estos genes (por ejemplo, Her2V664E) pueden provocar cáncer de mama. Comparando los perfiles de expresión génica en tejidos con cáncer de mama aislados de diferentes ratones quiméricos 45 conteniendo cada uno mutaciones en uno de estos genes, se puede obtener información con respecto a las diferentes rutas implicadas en el desarrollo (incluyendo inicio, mantenimiento y regresión) de cáncer de mama. Esta información será valiosa en la determinación de régimen terapéutico para cáncer de mama causado por diferentes lesiones genéticas.

50 B. Identificación de Biomarcadores Sustitutos

Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la invención también pueden usarse para identificar biomarcadores sustitutos para diagnóstico o para seguir la progresión de la enfermedad en un ratón. Los biomarcadores pueden identificarse basándose en las diferencias entre los perfiles de expresión para un ratón quimérico que ha desarrollado una enfermedad y uno que no ha desarrollado la enfermedad. Pueden ensayarse sangre, orina u otros fluidos corporales de los ratones con ELISA u otros ensayos para determinar qué biomarcadores se liberan del tejido enfermo a la circulación durante la génesis, mantenimiento, progresión o regresión de la enfermedad. Dicho diagnóstico puede implicar detectar el nivel de expresión o actividad del biomarcador, en el que un nivel anormalmente alto con relación al control (por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, 100%, 150%, 200%, 250% o 300% más alto) es indicativo de una condición anómala. Estos biomarcadores son particularmente útiles clínicamente en el seguimiento de progresión de enfermedad después de terapia de 60

enfermedad. Estos biomarcadores también pueden usarse clínicamente para evaluar la toxicidad de cualquier terapia de enfermedad.

C. Identificación de Agentes Terapéuticos

5 Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la invención pueden usarse para explorar agentes terapéuticos para tratar una enfermedad. Un método tal implica administrar un compuesto candidato a un ratón que ha desarrollado un cáncer. Después se puede observar el efecto del compuesto, si lo hubiera, en el cáncer. Se puede medir, por ejemplo, el tamaño del tumor, metástasis o angiogénesis. Como alternativa, se puede observar el efecto del compuesto en la expresión o nivel de actividad de un biomarcador para el cáncer.

D. Identificación de Genes Cruciales para Supervivencia o Función de Órganos

15 Para identificar un gen crucial para supervivencia o función de órganos, se puede evaluar la regeneración en un órgano que contiene células que tienen una alteración genética en un gen candidato. Una alteración genética de un gen candidato puede introducirse en una línea celular ES murina de modo que la expresión del gen candidato se inhibe o estimula a través de un mecanismo inducible. En un ratón quimérico resultante, la expresión del gen candidato en las células quiméricas puede inducirse por una molécula inductora o inhibirse por interferencia de ARN. Tras inducción o inhibición, el grado de quimerismo puede cambiar en el órgano. Por ejemplo, el porcentaje de células quiméricas puede cambiar en un hígado después de la inducción de la expresión de un gen candidato. Si la pérdida o sobreexpresión del producto génico candidato es perjudicial para la supervivencia de células del hígado, las células quiméricas morirán tras la inducción, y el quimerismo en el hígado se reducirá.

E. Estudio de Potencial de Diferenciación de Células ES Murinas

25 Se puede estudiar el potencial de diferenciación de tales células ES murinas *in vivo* en el contexto de tumorigénesis. Un ratón quimérico que tenga células que se originan de células ES que contienen ciertas alteraciones genéticas puede ser más propenso a desarrollar tumores en ciertos tejidos. Una comparación de desarrollo de tumor en diferentes tejidos de los ratones quiméricos proporcionará de este modo información sobre qué alteraciones genéticas provocan preferentemente tumores en qué tejidos.

F. Estudio de Interacciones Célula/Célula en Formación de Tumores

35 Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la invención pueden usarse para estudiar la contribución de la interacción célula/célula a formación de tumores. La interacción célula/célula puede implicar células que tengan diferentes fondos genéticos que se originan a partir de células ES de ratón que tienen diferentes alteraciones genéticas, o de células de ratón derivadas de dos fuentes diferentes, por ejemplo, las células ES introducidas y las células blastocísticas del hospedador.

40 Como ejemplo, el blastocisto hospedador para inyección de células ES se modifica genéticamente para permitir estudios de contribución del estroma al desarrollo del tumor. El blastocisto hospedador puede derivar de, por ejemplo, un ratón transgénico que produce niveles elevados de un factor de crecimiento o una citocina en un tejido específico; por lo tanto se puede estudiar el efecto de este factor de crecimiento o citocina en el desarrollo de tumores que surgen de descendencia celular de las células ES introducidas en ese tejido. El blastocisto hospedador también puede derivar de, por ejemplo, un ratón transgénico que es deficiente en cierto producto celular (por ejemplo, una molécula de adhesión, un factor de angiogénesis, un receptor o una molécula de señalización) en un tejido específico; por lo tanto se puede estudiar el papel de este producto celular al proporcionar apoyo del estroma para desarrollo de tumor en ese tejido.

50 En otro ejemplo, se introducen conjuntamente células ES de ratón de dos líneas celulares ES que tienen diferentes alteraciones genéticas en blastocistos y los ratones quiméricos resultantes pueden desarrollar un tumor que se origina a partir de ambas líneas celulares ES. La formación de tumores en tales ratones quiméricos puede compararse con ratones quiméricos que contienen células tumorales que se originan a partir de solamente una de las dos líneas celulares ES. Una comparación tal proporcionará información sobre el efecto de las interacciones entre células que tienen las diferentes alteraciones genéticas en formación de tumores.

G. Estudio de Toxicidad de un Elemento Genético

60 Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la presente invención pueden usarse para medir cuantitativamente la toxicidad de un elemento genético, por ejemplo, un gen introducido en una célula (por ejemplo, un oncogén inducible), un gen endógeno sobreexpresado, una construcción de ARNi contra un gen endógeno (por ejemplo, un gen supresor de tumores), una construcción que suprime un gen endógeno, etc. Para hacer esto, puede

generarse un ratón quimérico a partir de un blastocisto hospedador al que se han inyectado células ES que contienen el elemento genético de ensayo, no conteniendo el blastocisto hospedador en sí mismo este elemento genético de ensayo. Se puede comparar después el quimerismo del ratón con el de un ratón de control, por ejemplo, un ratón quimérico desarrollado con células ES de control que no contienen el elemento genético, o un ratón quimérico desarrollado con las mismas células ES pero el elemento genético de ensayo en esas células o descendencia de las mismas no se expresa (por ejemplo, inducido). Un grado más bajo de quimerismo indica que el elemento genético de ensayo afecta al desarrollo de forma negativa. Un grado más alto de quimerismo indica lo opuesto.

Puede usarse una diversidad de métodos para determinar el grado de quimerismo. Por ejemplo, puede obtenerse una biopsia del órgano y analizarse por métodos bioquímicos. Como alternativa, el embrión hospedador y la célula ES se modifican por ingeniería genética para expresar una proteína fluorescente diferente (por ejemplo, una GFP, RFP e YPF), y la relación de las dos señales fluorescentes, que es indicativa de quimerismo, se analiza por captura de imágenes *in vivo*.

H. Exploración de Supresor del Segundo Sitio de Mamíferos (MaSS)

Los ratones quiméricos obtenidos por el método de la presente invención pueden usarse en una exploración de MaSS para identificar genes relacionados con cáncer. En general, una exploración de MaSS implica: (a) mantener células en las que la tumorigenicidad depende de la expresión de un oncogén inducible en condiciones en las que la expresión del oncogén no se induce; (b) introducir en las células una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un retrovirus, que se integra en los genomas de las células, marcando de este modo los loci en los que se integra; (c) identificar células en las que se ha inducido tumorigenicidad por integración de la molécula de ácido nucleico; y (d) identificar genes que se han marcado por la molécula de ácido nucleico integrada. Se describen métodos y materiales para realización de una exploración de MaSS en el documento WO 02/079419.

IV. Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solamente para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Modelo de Cáncer de Pulmón HER2

La frecuencia de sobreexpresión de HER2/neu en cáncer de pulmón se ha estudiado principalmente en cáncer de pulmón de células no pequeñas, y las frecuencias publicadas de sobreexpresión de HER2/neu varían de 5 a 99%. Los pacientes con tumores positivos para HER2/neu tienen supervivencia significativamente más corta. También se ha mostrado que la sobreexpresión de HER2/neu contribuye a tumorigénesis en líneas celulares de tumor de pulmón. Véase, por ejemplo, Hirsch *et al.*, Lung Cancer 36: 263-4 (2002), y Gatzemeier *et al.*, Annals Oncology 15: 19-27 (2004). Sin embargo, los anticuerpos anti-HER2/neu (trastuzumab o HERCEPTIN[®]) no parecen eficaces en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas positivo para HER2 en seres humanos. Gatzemeier *et al.*, mencionado anteriormente.

Se produjeron ratones quiméricos que sobreexpresan de forma inducible HER2/neu en sus pulmones y desarrollan cáncer de pulmón poco después de la inducción. Estos ratones se usaron para mostrar una relación causa-efecto entre HER2/neu y cáncer de pulmón. Puesto que se usó una secuencia codificante de HER2/neu humana en la preparación de los ratones, los ratones son útiles para, entre otras cosas, desarrollar agentes terapéuticos de cáncer de pulmón que se dirigen a HER2/neu en pacientes humanos y para ensayar la eficacia anti-cáncer de pulmón de fármacos de HER2/neu conocidos. Los ratones se prepararon como sigue.

Se co-transfectó una línea celular ES INK4-/- en primer lugar con dos construcciones de expresión. La primera construcción (CCSP-rtTA) contenía una secuencia codificante de transactivador de tetraciclina inversa (rtTA) unida operativamente con un promotor de proteína secretora de células de Clara (CCSP) (Fisher *et al.*, Genes & Development 15: 3249-62 (2001)). La segunda construcción (TetO-luc) contenía una secuencia codificante de luciferasa (luc) unida operativamente a un promotor *fos* mínimo que contenía una secuencia operadora de tetraciclina (TetO). Se extrajeron líneas celulares ES que contenían tanto CCSP-rtTA como TetO-luc por co-transfección de estas dos construcciones junto con PGK-puomicina. Se aislaron clonalmente células resistentes a puomicina y se genotiparon por PCR y transferencia de Southern con respecto a la presencia tanto de CCSP-rtTA como de TetO-luc. Se inyectaron quince de estas líneas celulares resultantes en blastocistos para generar ratones quiméricos, para evaluar el rendimiento relativo de las líneas celulares. La expresión inducible del gen indicador de luciferasa en el pulmón se estudió *in vitro* por comparación de señales luminiscentes de muestras de pulmón diseccionadas de quimeras que se habían expuesto o no a doxiciclina.

Dos de las líneas celulares que pasaron el análisis de expresión inducible se transfectaron adicionalmente con una tercera construcción que contenía una secuencia codificante de HER2/neu humana unida operativamente a TetO. El producto polipeptídico de HER2/neu contenía una mutación V664E/Neu (es decir, sustitución de valina con ácido glutámico en la posición 664) junto con PGK-higromicina.659). Por tanto, en un ratón quimérico que contenía células descendidas de las células ES modificadas por ingeniería genética, la expresión del gen HER2/neu estaba bajo el control de rtTA y tetraciclina o un análogo de tetraciclina (por ejemplo, doxiciclina). Y puesto que el rtTA estaba bajo el control del promotor de CCSP específico de pulmón, el oncogén HER/neu se expresaría de forma inducible solamente en los pulmones.

Por lo tanto, se inyectaron doce de estas líneas celulares ES en blastocistos de ratón de hembras C57/BL6. Los blastocistos inyectados se transfirieron a madres sustitutas para gestación. Como se evaluó cualitativamente (por color del pelaje), aproximadamente 5% a más del 90% del cuerpo de los animales resultantes se desarrolló en modo mosaico a partir de las células ES modificadas por ingeniería genética. Se proporcionó después a los ratones agua para beber que contenía doxiciclina (2 mg/ml) la semana cuatro. Los tejidos pulmonares de los ratones quiméricos se analizaron por RT-PCR e inmunohistoquímica. Se observaron adenomas de pulmón en un periodo de siete semanas después de comenzar el tratamiento. En un periodo de dos a cinco meses, se desarrolló adenocarcinoma invasivo en los pulmones. Por lo tanto, estos datos demostraron que HER2/neu puede iniciar cáncer de pulmón.

Los ratones HER2/neu quiméricos proporcionaron varias ventajas frente a modelos de cáncer de pulmón transgénicos convencionales que contenían las mismas modificaciones genéticas. En ratones transgénicos que expresaron de forma inducible HER2/neu en los pulmones, se desarrolló hiperplasia grave por todos los pulmones en un periodo de dos a tres semanas desde la inducción. Los pulmones se volvieron no funcionales, dando como resultado la muerte antes de que cualquier tumor tuviera la oportunidad de desarrollarse. De forma similar, en ratones transgénicos que expresaban de forma inducible K-ras en los pulmones (Fisher *et al.*, mencionado anteriormente), las cargas tumorales eran tan altas que los animales morían antes de que los tumores tuvieran la oportunidad de volverse invasivos. En los ratones HER2/neu quiméricos, por el contrario, hubo suficiente tejido de pulmón sano restante para proporcionar supervivencia después de que se desarrollara hiperplasia. Como resultado, las células de pulmón transformadas tuvieron tiempo de progresar a tumores invasivos más malignos. Por lo tanto, los ratones quiméricos permitieron estudios más detallados de desarrollo de tumores.

Ejemplo 2: Modelo de Cáncer de Mama de HER2

Se co-transfectaron células ES nulas homocigotas para Ink4a con la siguientes cuatro construcciones, como fragmentos separados: MMTV-rtTA, TetO-Her2^{V664Eneu}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Se genotiparon células resistentes a puromicina por PCR y transferencia de Southern. La expresión inducible de los oncogenes en células ES se analizó por transferencia de Northern. Las células ES transfectadas se inyectaron en blastocistos C57BL/6, que se trasplantaron a ratones hembra pseudo-embarazadas para gestación que conduce a nacimiento de los ratones quiméricos.

Se usa la repetición terminal larga de virus de tumor de mama de ratón (MMTV) para dirigir la expresión específica de mama del transactivador de tetraciclina inversa (rtTA). El rtTA posibilita la expresión específica de mama del oncogén activado por HER2 cuando se proporciona doxiciclina a los ratones, por ejemplo, en su agua para beber.

La expresión inducible del oncogén HER2 y luciferasa se confirmó por RT-PCR y ensayo de luciferasa (respectivamente), usando células cultivadas derivadas del ratón. Se retiraron las glándulas mamarias de ratones quiméricos y se digirieron con colagenasa. La mitad de los organoides recogidos se cultivaron en presencia de doxiciclina, y la otra mitad se cultivó sin doxiciclina. Después de cinco días en cultivo, las células se tripsinizaron, y se usó un decimo de las células para ensayo de luciferasa, y el resto se usó para extracción de ARN.

El análisis histológico de tumores recogidos de ratones de modelo de cáncer de mama de HER2 mostró adenocarcinomas invasivos. Se distinguieron dos patrones principales. Fueron un patrón de crecimiento en lámina sólida, y un patrón de crecimiento anidado con centros necróticos.

El análisis inmunohistoquímico de tumores de mama de ratones de modelo de cáncer de mama de HER2 reveló dos tipos celulares dentro de los tumores. El primer tipo celular fue de origen epitelial (positivo para citoqueratina) y mostró expresión de HER2 y proliferación fuerte. El segundo tipo celular fue de origen mesenquimal con apariencia de tipo fibroblástica. Estas células fueron positivas para colágeno. Estas células no mostraron proliferación fuerte, y presentaron función del estroma. Se vio apoptosis en los centros necróticos de la parte epitelial de los tumores.

Se realizaron estudios de regresión tumoral usando los ratones de modelo de cáncer de mama de HER2. Se seleccionaron dos ratones, portando cada uno más de dos tumores inducidos por doxiciclina. El tamaño tumoral de dos tumores se midió usando calibradores antes y después de que se retirara la doxiciclina del agua para beber. La

doxiciclina se retiró el día seis. El tamaño tumoral se midió diariamente. Las mediciones de tamaños tumorales se usaron para calcular el volumen tumoral. Se representaron los resultados y se determinó la regresión de los tumores. Todos los tumores experimentaron regresión, presentando dependencia de doxiciclina (Figura 1 y 2). El análisis inmunohistoquímico de la regresión tumoral confirmó expresión de HER2 dependiente de doxiciclina. Por lo tanto, se

5

Ejemplo 3: Modelo de Cáncer de Mama de K-RAS

Se co-transfectaron células ES nulas homocigotas para Ink4a con las siguientes cuatro construcciones, como fragmentos separados: MMTV-rtTA, TetO-K-RAS^{G12V}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Se genotiparon células resistentes a puromicina por PCR y transferencia de Southern. La expresión inducible de los oncogenes en células ES se analizó por transferencia de Northern. Las células ES transfectadas se inyectaron en blastocistos C57BL/6, que se trasplantaron a ratones hembra pseudo-embarazadas para gestación que conduce a nacimiento de los ratones quiméricos.

10

15

La expresión inducible del oncogén de K-RAS y luciferasa se confirmó por RT-PCR y ensayo de luciferasa (respectivamente), usando células cultivadas derivadas del ratón. Las glándulas mamarias se retiraron de ratones quiméricos y se digirieron con colagenasa. La mitad de los organoides recogidos se cultivaron en presencia de doxiciclina, y la otra mitad se cultivó sin doxiciclina. Después de cinco días en cultivo, las células se tripsinizaron, y se usó un decimo de las células para ensayo de luciferasa, y el resto se usó para extracción de ARN.

20

El análisis histológico de tumores recogidos de ratones de modelo de cáncer de mama de K-RAS mostró hiperplasia en los conductos epiteliales de la glándula mamaria después de 2 meses en doxiciclina. Esta hiperplasia se observó hasta el final del periodo de observación (6 meses en doxiciclina).

25

Ejemplo 4: Modelo de Cáncer de Pulmón de K-RAS

Se co-transfectaron células ES nulas homocigotas para Ink4a con las siguientes cuatro construcciones, como fragmentos separados: MMTV-rtTA, TetO-K-RAS^{G12V}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Se genotiparon células resistentes a puromicina por PCR y transferencia de Southern. La expresión inducible de los oncogenes en células ES se analizó por transferencia de Northern. Las células ES transfectadas se inyectaron en blastocistos C57BL/6, que se trasplantaron a ratones hembra pseudo-embarazadas para gestación que conduce al nacimiento de los ratones quiméricos.

30

35

La expresión inducible del oncogén de K-RAS y luciferasa se confirmó por RT-PCR, transferencia de Northern y ensayo de luciferasa (respectivamente), usando tejido derivado de los pulmones de ratón. Los pulmones se retiraron de ratones quiméricos y se homogeneizaron. El material homogeneizado de ratones con y sin Doxiciclina se comparó en ensayos de Luciferasa y análisis de expresión de ARN.

40

El análisis histológico de pulmones de los ratones que tomaban doxiciclina reveló múltiples adenocarcinomas en el pulmón. Los adenocarcinomas pueden verse tan temprano como a los 3 meses con doxiciclina. Las quimeras con un bajo porcentaje de células ES mostraron una latencia más larga para desarrollo tumoral con una carga tumoral global reducida. Los tumores derivan de neumocitos de tipo II como se analiza por inmunohistoquímica usando anticuerpos contra los antígenos SPC y CC10.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un modelo de cáncer de ratón quimérico que comprende:
- 5 a) proporcionar una célula ES de ratón que comprende una mutación que suprime o inactiva un gen supresor de tumores,
b) transfectar la célula ES con
10 (i) un primer vector que comprende un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible que incluye un elemento de respuesta cuya actividad depende de un transactivador, y
(ii) un segundo vector que codifica el gen transactivador unido operativamente a un promotor específico de tejido,
c) inyectar la célula ES en un embrión de ratón, y
d) transferir el embrión a una madre sustituta de ratón.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el oncogén recombinante se selecciona del grupo que consiste en K-RAS, H-RAS, N-RAS, EGFR, MDM2, RhoC, AKT1, AKT2, c-myc, n-myc, β -catenina, PDGF, C-MET, PI3K-CA, CDK4, ciclina B1, ciclina D1, gen del receptor de estrógenos, gen del receptor de progesterona, Her2, ErbB1, ErbB3, ErbB4, TGF α , TGF- β , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2 PyV MT, y SV40 LT.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el oncogén recombinante es HER2, K-RAS o EGFR.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mutación implica un par de alelos nulos supresores de tumores seleccionados del grupo que consiste en Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Apaf1, Caspasa 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2 o NKX3.1, ATM, CHK2, ATR, BRCA1, BRAC2, MSH2, MSH6,
25 PMS2, Ku70, Ku80, DNA/PK, XRCC4 o MLH1, NF1, NF2, APC, WT, Patched y FHIT.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el par de alelos nulos supresores de tumor es un par de alelos nulos Ink4a.
- 30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el promotor inducible es un promotor de Tet-O.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el gen transactivador unido operativamente a un promotor específico de tejido es MMTV-rtTA o CCSP-rtTA.

Figura 1

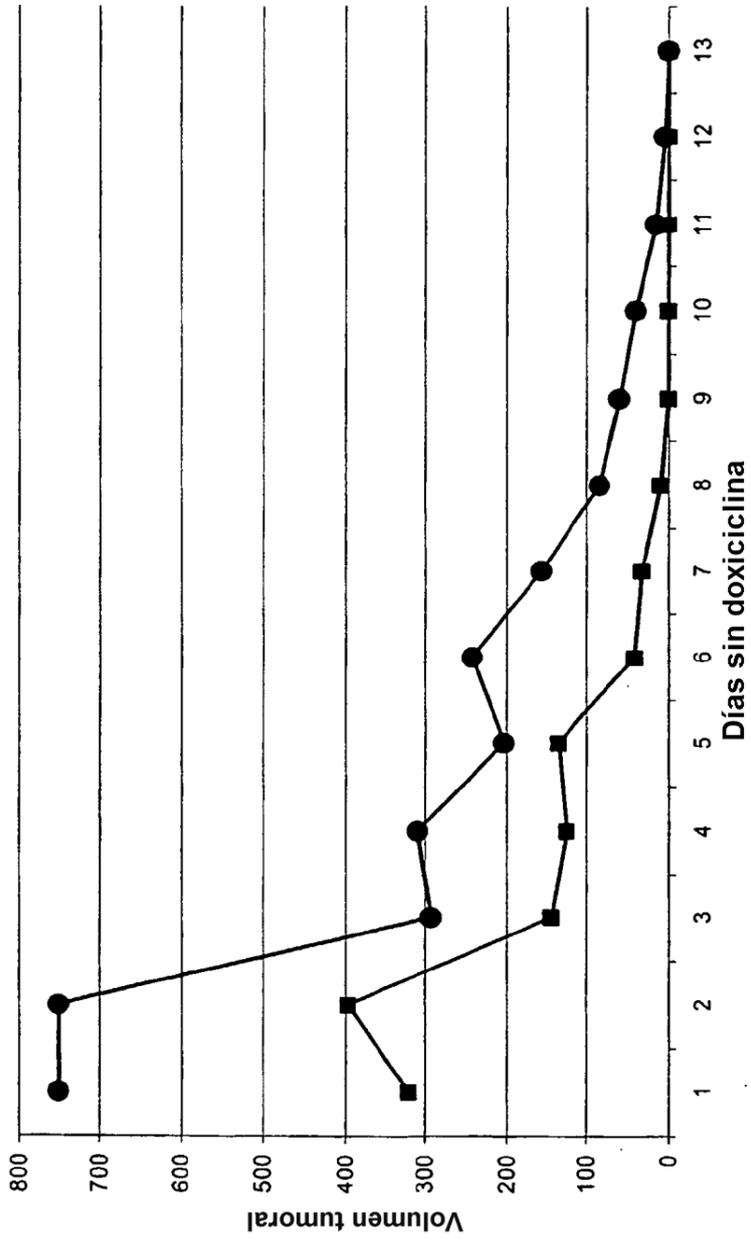
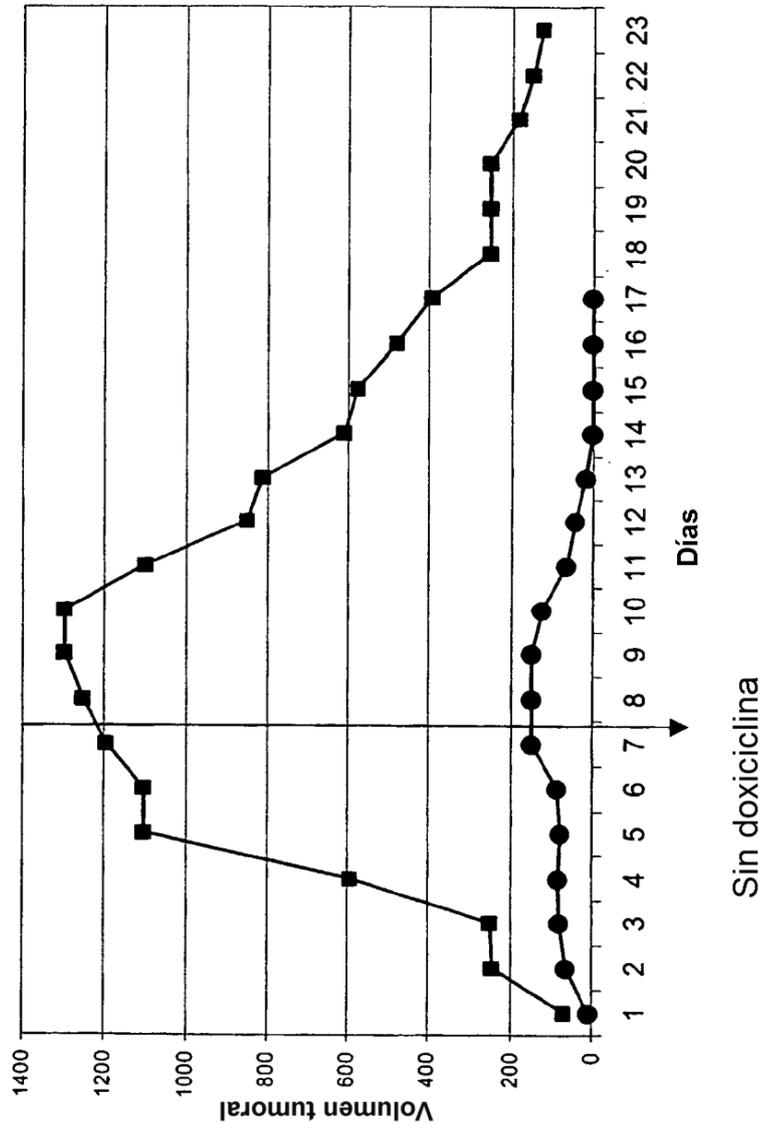


Figura 2



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- WO 0109308 A [0027]
- WO 02079419 A [0051]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

15

- CHIN et al. *Nature*, 1999, vol. 400, 468-472 [0013]
- FISHER et al. *Oncogene*, 1999, vol. 18, 5253-5260 [0015]
- CICHOWSKI et al. *Science*, 1999, vol. 286, 2172-2176 [0015]
- JACKSON-GRUSBY et al. *Oncogene*, 2002, vol. 21, 5504-5514 [0015]
- JOHNSON et al. *Nature*, 2001, vol. 410, 1111-6 [0021]
- EDLUND et al. *Science*, 1985, vol. 230, 912-916 [0028]
- KESSEL ; GRUSS. *Science*, 1990, vol. 249, 374-379 [0029]
- CAMPES ; TILGHMAN. *Genes Dev.*, 1989, vol. 3, 537-546 [0029]
- Gene Targeting, A Practical Approach. Oxford Press, 2000 [0030]
- HIRSCH et al. *Lung Cancer*, 2002, vol. 36, 263-4 [0053]
- GATZEMEIER et al. *Annals of Oncology*. 2004, vol. 15, 19-27 [0053]
- FISHER et al. *Genes & Development*, 2001, vol. 15, 3249-62 [0055]