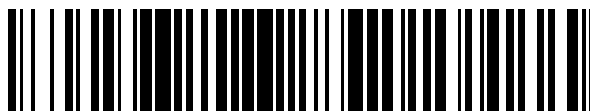


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 099**

51 Int. Cl.:  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05818667 .7**  
96 Fecha de presentación: **13.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1827087**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Animales transgénicos para evaluar el metabolismo y la toxicidad de un fármaco**

30 Prioridad:  
**13.12.2004 GB 0427172**  
**05.08.2005 GB 0516187**  
**10.08.2005 US 707077 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2012**

73 Titular/es:  
**ITI SCOTLAND LIMITED (100.0%)**  
**Atrium Court 50 Waterloo Street**  
**GlasgowG2 6HQ, GB**

72 Inventor/es:  
**WOLF, CHARLES R.;**  
**SCHEER, NICO y**  
**FAUST, NICOLE**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 391 099 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

Animales transgénicos para evaluar el metabolismo y la toxicidad de un fármaco

La presente invención se refiere a ratones transgénicos, o tejidos o células derivados de los mismos, y a procedimientos para producirlos. Los ratones transgénicos, o tejidos o células derivados de los mismos, proporcionan un sistema capaz de expresar proteínas humanas responsables del metabolismo de fármacos en el lugar de las proteínas de ratón endógenas homólogas y de la expresión controlada de genes humanos introducidos en el animal de tal manera que la expresión de los genes humanos se regula de una manera más fielmente análoga a la observada *in vivo* en seres humanos. Los ratones transgénicos, o tejidos o células derivados de los mismos, son para usar, especialmente pero no exclusivamente, en la evaluación del metabolismo, la toxicidad u otras propiedades de las sustancias xenobióticas o de fármacos o funciones de las proteínas humanas introducidas tales como el metabolismo y/o la síntesis de los compuestos endógenos.

**Antecedentes de la invención**

Una proporción significativa de candidatos farmacológicos terapéuticos no llegan a ser fármacos comerciales debido al metabolismo adverso o a la toxicidad descubiertos durante los estudios clínicos. Estos fracasos representan un derroche muy significativo de costes en desarrollo y por consiguiente existe una necesidad de nuevas tecnologías que puedan predecir de forma más fiable, rápida y económica, en la fase de desarrollo preclínico, las características metabólicas y toxicológicas de candidatos farmacológicos en seres humanos. Hasta ahora, la mayoría de los ensayos metabólicos y de toxicidad clínicos de candidatos farmacológicos se basan en líneas celulares y/o en tejidos en cultivo de animales de laboratorio, seres humanos y/o mamíferos. Sin embargo, ninguno de estos procedimientos es completamente fiable en la predicción del metabolismo o toxicidad en un sujeto humano. Los datos metabólicos y toxicológicos procedentes de animales pueden diferir significativamente de los obtenidos frente a un sujeto humano debido a las diferencias de especies en los mecanismos bioquímicos implicados. Además, la interpretación de los datos derivados de estudios de tejidos humanos aislados o cultivos de células humanas *in vitro* pueden ser problemáticos ya que tales sistemas no están disponibles en todos los órganos y tejidos o no conservan las mismas características metabólicas a las que poseen *in vivo*.

En la técnica anterior se sabe que el metabolismo, la distribución y la toxicidad de la mayoría de los fármacos depende de sus interacciones con cuatro clases distintas de proteínas principales:

a) enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1, tales como los citocromos P450 que generalmente añaden o exponen grupos polares en la molécula xenobiótica;

b) enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2, tales como transferasas, en particular las glucuronil transferasas, glutatión transferasas, sulfonil transferasas y acetil transferasas que conjugan la molécula xenobiótica polarizada con un grupo hidrófilo facilitando así su excreción posterior;

c) proteínas transportadoras de fármacos, tales como las proteínas de casete de unión a ATP que incluyen las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MDR, *Multi-Drug Resistance*) y proteínas asociadas a una resistencia a múltiples fármacos (MRP, *Multi-Drug Resistance-associated Proteins*) y los polipéptidos de transporte de aniones orgánicos (OATP, *Organic Anion Transporting Polypeptides*) que facilitan el transporte de fármacos y de otras moléculas xenobióticas a través de las membranas plasmáticas;

d) factores de transcripción, tales como el receptor de pregnano X (PXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR) que regula la transcripción de los genes que codifican las proteínas de las clases anteriores, en particular los citocromos P450.

La variación entre especies se conoce en cada una de estas clases de proteínas con respecto a la multiplicidad de las proteínas dentro de cada clase, la función de las propias proteínas y con respecto a la regulación genética de su expresión.

A partir del documento WO2004/007708 se sabe cómo producir animales transgénicos no humanos que expresen los P450 humanos en los que el funcionamiento de los citocromos P450 endógenos se ha anulado por supresión de genes P450 individuales o por supresión del gen citocromo P450 reductasa que codifica la enzima sobre la que depende la función de todos los citocromos P450. Sin embargo, el modelo animal descrito tiene limitaciones ya que no sólo los P450 introducidos están limitados a órganos o a tejidos particulares del animal no humano sino que tampoco existe ninguna disposición para regular la expresión de los P450 humanos de una manera que sea análoga a la observada en seres humanos. Uno de los modelos de la técnica anterior también está limitado ya que se necesitan modificaciones adicionales para proporcionar actividad citocromo P450 reductasa a los P450 humanos introducidos sin reactivación de los P450 no humanos endógenos. Una desventaja adicional reside en la ausencia de provisión para reproducir el metabolismo de fase 2 humano, por tanto el sistema es incapaz de proporcionar un perfil metabólico completo.

También se sabe de la técnica anterior humanizar la características de inducción de los citocromos P450 en el ratón expresando el PXR humano (Xie y col., *Nature* Vol 406, 435-9, 2000) o el CAR humano (Zhang y col., *Science* Vol

298, 422-4, 2002) en un ratón en el que se ha eliminado gen PXR de ratón y/o el gen CAR de ratón respectivamente. Aunque dichos animales demuestran patrones de inducción de los P450 endógenos que reproducen los observados en los seres humanos tienen características no deseables porque los citocromos P450, cuya expresión está regulada análogamente a la de los seres humanos, aún son citocromos P450 no humanos. Una desventaja adicional es que debido a que los propios genes PXR o CAR no están regulados como lo están en los seres humanos en virtud del transgen dirigido por un promotor específico tisular heterólogo (promotor de albúmina), puede ocurrir que la sobreexpresión del gen heterólogo pueda tener el resultado que se desvíe una ruta metabólica normal. Además, los transgenes PXR y CAR derivan de un ADNc en lugar de un clon genómico, por tanto consecuentemente los animales no humanos transgénicos no tienen las secuencias necesarias para reproducir correctamente toda la regulación transcripcional y post-transcripcional de la expresión de PXR o CAR dado que su expresión está limitada al hígado y puede no ser de un nivel fisiológico. Además estos modelos no codifican variantes de corte y empalme de los genes humanos. Otro inconveniente de los modelos PXR/CAR es que no son adecuados para combinar con modificaciones de otros genes dentro de un animal ya que la humanización de cada gen se consigue mediante dos modificaciones genómicas independientes: (i) inactivación del gen endógeno (ii) transgénesis con el ortólogo humano bajo el control del promotor de albúmina en una localización genómica diferente.

Existe por lo tanto necesidad de mejoras en los modelos animales del metabolismo humano que puedan controlar la expresión de genes humanos introducidos en el animal de manera que su expresión se regule de una manera más fielmente análoga a la observada en seres humanos. También existe necesidad de que se reproduzcan más aspectos de la ruta metabólica humana. Los modelos animales eficaces del metabolismo humano no solo requieren la expresión de las proteínas humanas relevantes sino también la anulación de las funciones de las proteínas endógenas homólogas.

Una razón de por qué la presente invención representa un sorprendente avance sobre la técnica anterior es porque muchos investigadores de la técnica anterior parecían opinar que ya estaba resuelto el problema de plantear la necesidad de modelos del metabolismo de fármacos. Por ejemplo, Xie y Evans (2002, DDT7, p509) afirman que la humanización de PXR es "uno de los raros ejemplos en los que el reemplazo de un solo regulador transcripcional permite la conversión de la regulación de genes específicos de especies". Adicionalmente, es evidente que los profesionales han dirigido su atención a técnicas que difieren notablemente de las que usan sistemas con animales transgénicos. Por ejemplo, se realizaron intentos para humanizar el hígado de ratón como un órgano usando hepatocitos humanos, siendo el objetivo obtener un modelo de ratón para el metabolismo de fármacos en seres humanos. Sin embargo, este trabajo es laborioso y la opinión de los autores de la presente invención es de una relevancia cuestionable con respecto a la situación en la realidad.

La presente invención supone la primera metodología que tiene en cuenta todos los problemas de los que adolecen los sistemas de la técnica anterior y pretende resolver estos problemas de una manera práctica. Los autores de la presente invención han reconocido que, para proporcionar modelos de ratón transgénicos con rutas del metabolismo de fármacos humanizadas que superen las características no deseadas de los modelos animales descritos en la técnica anterior, deben satisfacerse, de manera ideal, diversos criterios:

- a) Regulación de la expresión de las proteínas humanas introducidas de manera que se reproduzcan los patrones de expresión en el ser humano;
- b) Expresión de proteínas humanas múltiples de manera que se reproduzcan aspectos múltiples del metabolismo humano;
- c) Expresión o función anulada de los genes endógenos múltiples de manera que se reduzca significativamente la interferencia de las rutas metabólicas no humanas sobre las funciones de las proteínas humanas introducidas.

En la presente invención, se proporcionan procedimientos de producción de células de ratón y ratones transgénicos que incorporan al menos algunas, si no todas, de estas cualidades deseadas. Dichas células de ratón y ratones transgénicos poseen características deseables no disponibles en la técnica anterior porque pueden modelar rutas humanas completas del metabolismo de sustancias xenobióticas en lugar de tan solo elementos individuales de las rutas y porque dichos modelos se proporcionan para todos los tejidos y órganos. Esto se consigue aplicando las estrategias técnicas hasta ahora no disponibles en la técnica anterior con respecto a la obtención de la regulación de la expresión de transgenes análoga a la observada en las células humanas usando secuencias de ADN ampliamente reguladoras y con respecto a la anulación de rutas metabólicas endógenas por supresión o cambio genético. Diversas proteínas humanas relevantes se expresan en un solo animal.

#### **Declaración de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un ratón transgénico, tejidos o células derivadas del mismo, que incorporan en su genoma al menos una secuencia de ADN humana que codifica al menos un factor de transcripción bajo el control de un promotor de factor de transcripción y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado, incorporando adicionalmente el ratón, tejidos o células derivados del mismo, al menos una o más de las siguientes secuencias de ADN humano adicionales seleccionadas del grupo que comprende:

- (i) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1;
- (ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o
- (iii) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos

y cuyo gen, o genes, equivalente endógeno se ha anulado;

- 5 en el que la secuencia humana que codifica al menos un factor de transcripción se inserta en el punto en el genoma en el que existe de modo natural el gen endógeno equivalente; y en el que el factor de transcripción se selecciona del grupo que comprende el receptor de pregnano X (PXR/SXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR) o una combinación de los mismos.

10 A lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones que se indican después, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprende”, o variaciones tales como “que comprende” o “comprendiendo”, se entenderán que implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

15 La referencia en el presente documento a “gen equivalente endógeno” del animal no humano pretende incluir un gen o genes cuyo producto de expresión conserven la misma, similar o idéntica función que la del gen homólogo humano. Por ejemplo, el gen del factor de transcripción humano conocido como PXR (NR1I2 receptor nuclear subfamilia 1, grupo I, miembro 2), Entrez GeneID: 8856, tiene un homólogo murino del mismo nombre cuyo Entrez GeneID es 18171. Las proteínas codificadas por estos genes tienen una función equivalente en los organismos de los cuales derivan.

20 Generalmente, el gen del factor de transcripción introducido, el gen de la enzima metabolizante de fármacos de fase 1, el gen de la enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o el gen de la proteína transportadora de fármacos compartirán un grado de homología con el gen endógeno con el cual es equivalente. Preferentemente, el grado de homología será mayor del 30 %, mayor del 40 %, mayor del 50 %, mayor del 60 %, mayor del 70 %, mayor del 80 %, mayor del 90 % o incluso mayor del 95 %.

25 En el caso de los genes de enzimas metabolizantes de fármacos, la equivalencia entre genes puede evaluarse mediante una combinación de especificidad de sustrato, modo de regulación (por ejemplo, mediante factores de transcripción o fármacos exógenos), homología de secuencia y distribución tisular. Determinados genes tienen equivalentes exactos; son ejemplos de dichos genes CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2. CYP2B6 y CYP2D son ejemplos en los que sólo hay un gen en el ser humano, pero numerosos genes equivalentes en el ratón. Existen cuatro genes CYP2C en el ser humano y numerosos genes equivalentes en el ratón. En tales circunstancias, al menos uno, preferentemente dos, tres, cuatro, cinco o más o incluso todos los genes murinos equivalentes se anulan. CYP3A4 es un ejemplo en el que no hay un ortólogo obvio en el ratón, aunque CYP3A11 podría considerarse al menos un gen de ratón equivalente debido a su expresión hepática, modo de regulación y homología de secuencia.

35 La referencia en el presente documento a “anulado” pretende incluir el silenciamiento o la supresión o hacer que sea inactivo, de tal manera que el gen equivalente endógeno del animal no humano sea incapaz de expresar el producto (o productos) génico, al menos no a cualquier nivel que sea significativo para los procesos del metabolismo de fármacos. Por ejemplo, el nivel de expresión de un gen anulado puede ser menor del 20 %, preferentemente menor del 10 %, más preferentemente menor del 5 %, más preferentemente menor del 2 %, incluso más preferentemente del 1 % o menor del nivel de expresión del tipo silvestre. Preferentemente, la expresión de un gen anulado puede disminuirse hasta el punto en el que no pueda detectarse.

#### 40 **Secuencias genómicas parciales**

En las técnicas anteriores descritas hasta ahora, los investigadores han generado modelos transgénicos que incorporan genes humanos en sistemas no humanos, particularmente el ratón. Sin embargo, en el diseño de estos sistemas, se ha prestado escasa atención a conservar el contexto del gen humano tal como este existe en su estado natural.

45 Generalmente, en la técnica anterior se han usado secuencias de ADNc en lugar de respetar la estructura de intrón/exón del gen humano o incorporando el gen humano en su totalidad, conteniendo secuencias tanto intrónicas como exónicas. Esto significa que no podían formarse ninguna de las variantes de corte y empalme que pudiesen generarse de modo natural. Las variantes de corte y empalme son importantes por diversas razones. En primer lugar, estas pueden tener una función. En segundo lugar, estas pueden tener un efecto negativo dominante, por ejemplo, uniéndose a sus proteínas compañeras habituales y modificando efectos biológicos de la proteína. En tercer lugar, pueden secuestrar ligandos. Por lo tanto, un sistema que refleje de manera exacta la situación *in vivo* refleja el equilibrio de las variantes de corte y empalme que existen en cualquier sistema biológico.

El uso de ADNc también significa que los niveles de ARNm se generan artificialmente y pueden no reflejar la realidad de la situación fisiológica natural.

55

Por el contrario, la presente invención intenta reflejar la situación *in vivo* proporcionando el gen en su totalidad cuando esto sea posible. Esto significa que los empalmes intrón-exón se conservan como en el sistema natural de manera que los eventos de corte y empalme puedan suceder exactamente como en la situación natural. Cuando, quizás debido a la longitud de un gen, no sea sencillo transponer todo el gen en un sistema transgénico, la invención busca usar una combinación de ADNc y ADN genómico en sus construcciones de manera que se conserven los límites intrón-exón importantes, en los que se producen la mayoría de los eventos de corte y empalme.

De acuerdo con la invención, por lo tanto, cuando se sabe que la mayoría de las variantes de corte y empalme ocurren como un resultado de variación de corte y empalme dentro de un intrón particular, este intrón se incorpora preferentemente como ADN genómico en la construcción, mientras que las secuencias intrónicas menos influyentes no se conservan. Esto hace que los niveles de ARNm funcional y proteína funcional reflejan los niveles que se encuentran *in vivo* en respuesta a la exposición a un fármaco, o a un cóctel de fármacos, en particular. Esto es lo que se requiere idealmente para un modelo fisiológicamente relevante.

Por consiguiente, mientras puedan usarse secuencias de ADNc, en preferencia a estas secuencias, la invención puede usar una combinación de ADNc y secuencias genómicas procedentes del gen que va a humanizarse. Por ejemplo, en el caso de un animal transgénico que exprese el gen PXR humano, debido al gran tamaño de más de 35 kb del gen PXR humano, la estructura intrón-exón entre los exones 4 y 6 se mantiene preferentemente, dado que la mayoría de las variantes de corte y empalme se observan en esta región genómica, dado que se localiza dentro del dominio de unión al ligando. Esto conserva ventajosamente la secuencia en la que se observan la mayoría de las variantes de corte y empalme y se localiza convenientemente dentro del dominio de unión al ligando.

Otro ejemplo lo proporciona el caso del casete de humanización preferentemente usado para CYP3A4: este puede contener el promotor de CYP3A4 humano de 13 kb, 1 exón y 1 intrón, como en la constitución genómica normal y un ADNc humano que consiste en 2-13 exones.

Otro ejemplo lo proporciona el caso del casete de humanización preferentemente usado para CYP2C9: este puede contener el promotor de CYP2C9 humano de 12 kb, un ADNc humano de 1-4 exones, 4 intrones y un ADNc de 5-9 exones.

### Secuencias genómicas completas

Pueden usarse secuencias de ADN genómicas completas. Por ejemplo, en el caso de un animal transgénico que exprese un gen CAR humano, el tamaño relativamente pequeño del CAR humano, que comprende aproximadamente 7 kb del exón 2-9, hace que sea simple conservar toda la estructura genómica en el vector diana. Preferentemente la construcción debe conservar la estructura intrón-exón entre los exones 2 y 9. De manera ventajosa, esta conserva la estructura genómica completa dentro del vector diana y permite incluir todas las variantes de corte y empalme del CAR humano. Preferentemente, la secuencia genómica del CAR humano se fusiona con el sitio de inicio de la traducción del gen CAR de ratón. La secuencia CAR humana contiene por tanto todas las secuencias genómicas de los exones 1-9. Las UTR 5' y 3' pueden ser humanas o pueden conservarse las procedentes del genoma de ratón. Las restantes partes de las secuencias codificantes del gen CAR de ratón pueden eliminarse.

### Factores de transcripción

El ADN humano que codifica un factor de transcripción se selecciona del grupo que comprende el receptor de pregnano X (PXR, también conocido como receptor de esteroides y de sustancias xenobióticas SXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR) o múltiples de los mismos o una combinación de los mismos. Los ratones y las células de acuerdo con este aspecto de la invención son ventajosos por las razones descritas con detalle anteriormente. Por ejemplo, pruebas recientes apoyan adicionalmente el argumento de los dominios de unión a ligando de las proteínas CAR murinas y humanas son divergentes con respecto a otros receptores de hormonas nucleares, dando como resultando diferencias específicas de especies en respuestas a sustancias xenobióticas (Huang y col., 2004, Molecular endocrinology 18 (10): 2402-2408). Los resultados publicados en este documento demuestran que un solo compuesto puede inducir respuestas opuestas a sustancias xenobióticas mediante receptores ortólogos en roedores y seres humanos.

Se han creado ratones transgénicos para el PXR humano y se describen en los ejemplos incluidos en el presente documento. Se ha descubierto que el PXR humano se expresa tanto en el hígado como en el tracto GI de ratones en la manera antes citada a niveles equivalentes a los de los genes de ratón endógenos. De este modo, se evitan los problemas típicos surgidos con las técnicas convencionales de este tipo, tales como sobre- o infra-expresión. Adicionalmente, los modelos de PXR humanizados actualmente disponibles usan el promotor de albúmina para dirigir el PXR humano que se ha cruzado en un fondo nulo para PXR. Por lo tanto, PXR se expresa a niveles muy altos en este modelo y no hay PXR en ningún tejido que no sea el hígado. Esto compromete gravemente el uso de este modelo para entender la función del hPXR en el control de la expresión de genes en el tracto GI o en la barrera hematoencefálica o, de hecho, en cualquier otro tejido.

En este modelo, también se ha observado que la proteína PXR es funcional ya que los ratones son sensibles a compuestos tales como rifampicina y TCPOBOP que se sabe que inducen la expresión de genes mediante esta ruta.

Se han demostrado diferencias de cepas entre ratones de tipo silvestre y humanizado. Por ejemplo, se ha observado que los ratones humanizados son más sensibles a compuestos tales como rifampicina, que se sabe que son más activos al hPXR. Por tanto, los animales PXR humanizados demuestran una sensibilidad modificada a rifampicina con respecto a los del tipo silvestre.

- 5 Adicionalmente, hubo una actividad enzimática P450 de fondo claramente mayor medida por la 16-beta-hidroxilación de testosterona y la desmetilación de la 7-benziloxiquinolona entre los ratones de PXR de tipo silvestre y humanizado.

10 En experimentos que usan el agente de inducción TCPOBOP, se midió el metabolismo microsomal hepático de la testosterona. De nuevo se observaron claras diferencias entre los animales PXR de tipo silvestre y humanizado. En particular, la 7-alfa-hidroxilación de la testosterona fue constitutivamente mayor en los animales huPXR con respecto a los del tipo silvestre.

15 Coherente con las diferencias de cepas en el PXR de tipo silvestre y humano, hubo diferencias notables en la sensibilidad de las líneas de ratón con respecto a la inducción por TCPOBOP. En el caso de la 16-alfa-hidroxilación de la testosterona, esta actividad se indujo significativamente en los animales de tipo silvestre pero no en los animales PXR humanizados. De interés particular fue la observación de que la inducción de la 16-beta-hidroxilación de la testosterona fue mucho más notable en los animales de tipo silvestre que en los huPXR. De hecho, a una dosis de 1 mg/kg, la inducción de la 16-beta-hidroxilación de la testosterona fue de aproximadamente seis veces en los animales de tipo silvestre pero solo de 1,7-veces en los animales huPXR. Esto demuestra de nuevo una sensibilidad reducida de los ratones humanizados con respecto a los controles.

20 Preferentemente, los ratones transgénicos y las células de acuerdo con este aspecto de la invención demuestran las propiedades funcionales descritas anteriormente. Por ejemplo, preferentemente, dichas células y ratones no presentan inducción de actividad Cyp2b10 en respuesta a rifampicina. Sin embargo, dichas células y ratones presentan un efecto de inducción para CYP3A11, no solo con la rifampicina sino también para TCPOBOP.

25 Se apreciará que, en la presente invención, también puede usarse otro ADN (o ADNs) humano que codifique un factor de transcripción siempre que sea capaz de regular una enzima metabolizante de fármacos de fase 1, una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o una proteína transportadora de fármacos. Los ejemplos incluyen los PPAR ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ), el NRF2, el receptor Ah, el HNF1 y el HNF4.

30 Preferentemente, el ADN humano que codifica un factor de transcripción comprende tanto el receptor de pregnano X (PXR) como el receptor constitutivo de androstano (CAR). En esta realización de la invención el ratón transgénico, o tejidos o células derivadas del mismo, pueden considerarse como "doble-humanizado" para estos genes de factor de transcripción. Dichos modelos doble humanizados son ventajosos sobre los modelos que sólo incorporan un único gen (PXR o CAR) porque muchas enzimas metabolizantes de fármacos o transportadoras de fármacos poseen elementos que son sensibles a la unión tanto de CAR como de PXR. Adicionalmente, la cantidad de elementos sensibles a PXR a menudo difieren de la cantidad de elementos sensibles a CAR y por eso la regulación mediante  
35 ambos factores de transcripción es generalmente importante. Por consiguiente, se prefieren modelos que tengan en cuenta los efectos de ambos factores y que reflejen más fielmente la situación fisiológica *in vivo*.

Se han creado ratones transgénicos tanto para el PXR humano como para el CAR humano y se describen en los ejemplos incluidos en el presente documento. Se han realizado estudios preliminares sobre la actividad de estos factores de transcripción en combinación, determinada midiendo el tiempo de sueño inducido por barbitúricos.  
40 Desde hace mucho tiempo se sabe que el tiempo de sueño es directamente proporcional a la actividad hepática del citocromo P450 y esta actividad puede atribuirse, al menos en parte, a los niveles del P450 en el hígado determinados por la función del CAR y del PXR. Mientras que los ratones de tipo silvestre, a los que administraba una dosis narcótica de pentobarbitona, dormían durante 21 minutos, los ratones doble humanizados para CAR y PXR dormían durante 34 minutos. Por lo tanto, estos ratones demuestran una diferencia significativa con respecto a  
45 sus controles de tipo silvestre indicando que el ratón doble humanizado tiene una marcada diferencia en su respuesta a fármacos con respecto a los animales de tipo silvestre.

Preferentemente, los ratones transgénicos, y las células de acuerdo con este aspecto de la invención, demuestran las propiedades funcionales descritas anteriormente. Por ejemplo, preferentemente, las células y los ratones transgénicos para el PXR humano, no presentan inducción de actividad Cyp2b10 en respuesta a rifampicina, pero sí  
50 presentan un efecto de inducción para CYP3A11, no sólo con rifampicina sino también para TCPOBOP.

Los autores de la presente invención también han observado que la capacidad de los promotores para inducir la expresión enzimática es diferente en diferentes tejidos. Por consiguiente, es de suma importancia, usar los factores de transcripción humanos en lugar de los factores de transcripción endógenos del otro animal. Adicionalmente, las secuencias reguladoras de los factores de transcripción y los genes que estos regulan deben reflejar la situación  
55 fisiológica natural tan fielmente como sea posible. Para garantizar que esto suceda, el uso de tantos factores de transcripción humanos, enzimas humanas metabolizantes de fármacos y transportadores humanos de fármacos como sea posible, es importante.

La proporción de los niveles de proteína que genera un fármaco en particular también tiene una importancia significativa. Por ejemplo, la acción del PXR de ratón estimula la expresión de diferentes proteínas en comparación con la acción del PXR humano y a diferentes niveles. Los niveles de un fármaco y de sus metabolitos en particular dependen crucialmente de las enzimas metabolizantes y de los transportadores de fármacos que se expresen y, de nuevo, es sumamente importante, que se usen los factores de transcripción humanos en lugar de los factores de transcripción endógenos del otro animal.

El uso de los factores de transcripción humanos es también importante desde un punto de vista toxicológico. Por ejemplo, los ácidos biliares regulan de modo natural el PXR y otros compuestos fisiológicos y afecciones tóxicas tales como necrosis biliar y colestasis biliar pueden resultar de la exposición a un fármaco particular. Por lo tanto, puede ser que, como resultado de las diferencias entre el metabolismo de fármacos entre un ser humano y un animal de ensayo, se observe un efecto tóxico en este animal que pudiera no manifestarse en el ser humano.

Las secuencias reguladoras que rigen la expresión del factor (o factores) de transcripción pueden ser preferentemente de origen humano, o pueden originarse a partir de la especie animal diana, el ratón.

### Enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1

Preferentemente, el ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 se selecciona en el grupo que comprende los citocromos P450, incluyendo pero sin limitación CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP2B6. Se apreciará que, en la presente invención, también pueden incluirse otros ADN que codifiquen una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 siempre que puedan modificar una sustancia xenobiótica añadiendo o exponiendo un grupo polar sobre la molécula xenobiótica.

La elección de isoformas humanas del P450 para la introducción en ratones P450 humanizados se impulsa predominantemente por la importancia relativa de diversas isoformas del P450 conocidas en el metabolismo en tejidos relevantes. Por tanto, por ejemplo, hasta ahora la única isoforma del P450 más significativa reconocida en el hígado humano es la isoforma CYP3A4, y por eso la CYP3A4 es por tanto probablemente la primera isoforma humana de elección del P450 para la humanización del P450 del hígado. La elección de las P450 humanas para el ratón multi-P450 humanizado de la presente invención se dictamina según la necesidad del usuario. A este respecto se espera que se preferirán cualquiera de una o más de las siguientes isoformas humanas: 3A4, 2D6, 2B6, 2C9, 2C19, 1A2, 2C8. Sin embargo, se apreciará que la isoforma (o isoformas) incorporada en la célula del animal depende de los requisitos del usuario. De esta manera, el animal transgénico humanizado puede "diseñarse" para investigar la función de isoformas específicas en el proceso metabólico.

De acuerdo con las enseñanzas de la invención, pueden reemplazarse genes sencillos, grupos génicos o combinaciones de genes sencillos o grupos génicos. Los grupos génicos completos deben reemplazarse preferentemente cuando sea posible, en lugar de simplemente reemplazar genes individuales. Esto genera una situación en la que las proporciones de los niveles de expresión de genes en cualquier grupo génico son iguales a las proporciones en las que estos genes se expresan *in vivo*. Este es un fenómeno que no se ha tenido en cuenta en la técnica anterior. Se prefieren los grupos CYP3A y CYP2C, grupos de enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1 para el reemplazo de acuerdo con la presente invención. Cualquiera de uno, o incluso ambos de estos grupos génicos puede reemplazarse de acuerdo con la presente invención.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, pueden reemplazarse preferentemente cascadas parciales, o preferentemente completas, de genes que están implicados en una ruta particular. Esto garantiza que se conserve la redundancia parcial de la función génica y también, de nuevo, que se refleje la situación fisiológica real. El grupo CYP3A del P450 puede ofrecerse como un ejemplo. En seres humanos, hay cuatro genes funcionales en este grupo, que tienen especificidad de sustrato solapante. La proteína CYP3A5 metabolizará, por ejemplo, sustratos CYP3A4. Por lo tanto, si se hace un intento de generar un modelo de metabolismo de fármacos, la incorporación del gen CYP3A5 en cualquier estado distinto como parte de su grupo génico completo el modelo generado se distancia de la realidad.

Por el contrario, siguiendo las enseñanzas de la técnica anterior, si un investigador decide que sería una buena idea generar un animal transgénico para el gen CYP3A5, solo sabría incorporar este gen y no pensaría en incorporar todo el grupo génico de que forma parte. Adicionalmente, usando técnicas de la técnica anterior, se insertaría en cualquier sitio arbitrario y no en su posición contextual natural en el genoma. Lo que es aún peor, su expresión estaría bajo la dirección de un fuerte promotor específico para el hígado. Esta estrategia generaría muy probablemente una gran cantidad de proteína CYP3A5 en el hígado y debido a la gran cantidad de proteína proporcionada, esta proteína metabolizaría sustratos a una tasa mayor que a la que lo haría *in vivo*. Por todas estas razones, el procedimiento de la invención es ventajoso sobre sistemas que se han descrito anteriormente.

Preferentemente, los grupos de enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1 que se usan para la humanización son el grupo CYP3A y el grupo CYP2C.

En vista de la redundancia en cuanto a la función de las proteínas entre los animales transgénicos diana normalmente usados, tales como el ratón, y el ser humano, la humanización para enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1 se realiza preferentemente contra un fondo suprimido en el que solamente alguna (por ejemplo

1, 2, 3, 4 ó 5) y preferentemente ninguna de las enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1 de los animales diana se expresará a niveles significativos.

### Enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2

5 Preferentemente, el ADN humano que codifica una enzima metabolizante de un fármaco de fase 2 se selecciona del grupo que comprende las glucuronil transferasas, por ejemplo, el gen o grupo génico UGT1A, las glutatión transferasas, por ejemplo GST (glutatión S-transferasa), las sulfonil transferasas y las acetil transferasas. Se apreciará que, en la presente invención, también pueden incluirse otros ADN que codifiquen una enzima metabolizante de un fármaco de fase 2 siempre que puedan conjugar un producto del metabolismo de fase 1.

10 Preferentemente, un grupo de enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2 que se usa para la humanización es el grupo génico UGT1A.

### Transportadores de fármacos

15 Preferentemente, el ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos se selecciona del grupo que comprende las proteínas de casete de unión a ATP que incluyen, pero sin limitación, las proteínas de resistencia a múltiples fármacos, por ejemplo MDR-1, y las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP), por ejemplo MRP1 y/o MRP2, o de los polipéptidos de transporte de aniones orgánicos (OATP). Se apreciará que, en la presente invención, también pueden incluirse otros ADN que codifiquen una proteína transportadora de fármacos siempre que puedan facilitar el transporte de fármacos y de otras moléculas xenobióticas a través de las membranas plasmáticas.

Preferentemente, la proteína de resistencia a múltiples fármacos es MDR1.

20 Preferentemente, la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos es MRP1.

### Secuencias reguladoras

25 La presente invención reside en la humanización de ratones transgénicos, células, tejidos o animales especialmente para el factor (factores) transcripcional (transcripcionales), en el que los transgenes del factor transcripcional son dirigidos por promotores del factor transcripcional, es decir, están "genosustituidos" (*knock-in*) en lugar de usar promotores específicos de albúmina/ tejidos heterólogos. Por tanto los ratones de la presente invención pueden expresar proteínas humanas no solo a niveles fisiológicos apropiados sino en todos los tejidos en lugar de sólo en el hígado, como se conocía de la técnica anterior.

30 Se apreciará que, cualquiera de las secuencias de ADN humano que incluya secuencias codificantes de proteínas seleccionadas del grupo de clases de enzimas humanas del metabolismo de fase 1, enzimas humanas del metabolismo de fase 2; transportadores humanos de fármacos; factores de transcripción humanos, puede unirse operativamente, de manera ideal, a secuencias reguladoras de ADN humano.

35 Preferentemente, estas secuencias de ADN humano de los factores de transcripción descritas anteriormente y de otras proteínas son genes completos o son construcciones de ADN que comprenden genes reguladores que pueden derivar de seres humanos o de animales. En el caso en que los genes reguladores no sean de origen humano, los genes reguladores pueden derivar del animal diana, por ejemplo, el ratón. Por genes reguladores se entiende que incluye cualquiera de las secuencias promotoras o potenciadoras, las UTR 5' ó 3', las secuencias de terminación poli-A u otras secuencias de ADN, que son necesarias para la transcripción del gen de interés. Los transcritos usados para la inserción de secuencias humanas terminan preferentemente en un motivo poli-A.

40 Generalmente, en la técnica anterior, se han usado promotores heterólogos y los usados (tal como el promotor de albúmina) son generalmente promotores fuertes, independientes de ligandos en cuanto a su acción y están constitutivamente activados. En el desarrollo normal, la albúmina sólo se expresa neonatalmente. Esto separa la expresión de la proteína codificada por el gen de la situación natural en la realidad, ya que las señales reguladoras que dirigen la transcripción de los genes y la posterior traducción del producto ARNm no se conserva en el sistema transgénico. Los investigadores en la técnica anterior volvieron a usar dichos promotores por diversas razones. En parte, se sintió la necesidad de hacer esto porque las señales de transcripción proporcionadas por los promotores endógenos no parecían ser lo suficientemente fuertes. Adicionalmente, se pensó que era necesario el uso de promotores que se había observado que eran eficaces en el ratón.

50 Por otro lado, la invención incorpora preferentemente el promotor endógeno con el gen humano para conservar la fidelidad de la expresión humana de tipo silvestre, evolutivamente, temporalmente y de una manera específica de tejidos.

Por "promotor endógeno" se entiende el promotor que dirige de modo natural la expresión del gen de interés. El promotor endógeno puede ser por tanto el promotor endógeno humano o, como alternativa, puede ser el promotor que es endógeno para ese gen introducido en el sujeto ratón transgénico. En ratones transgénicos, la expresión del gen humano puede dirigirse por el promotor endógeno del ratón para ese gen. Incorporando toda la secuencia 5'



cadena arriba que es necesaria para la actividad del promotor, preferentemente incluyendo cualquiera de los potenciadores, se ha observado que no es de hecho necesario usar fuertes promotores constitutivos; como en la situación natural, el promotor endógeno, en su totalidad, es perfectamente capaz de dirigir la expresión de la proteína relevante de una manera fisiológicamente relevante. Un ejemplo lo proporciona el gen CYP3A4, que posee fuertes elementos potenciadores de hasta 13 kb cadena arriba del punto de inicio de la transcripción. Mientras que la incorporación de toda esta secuencia permite que se produzca el mecanismo de la transcripción apropiado, la omisión de estas secuencias cadena arriba conduce a un sistema en el que las secuencias reguladoras incompletas o insuficientes están presentes para permitir conservar la fidelidad de la expresión del gen.

Un resultado del uso de promotores, tales como el promotor de albúmina, que se usaron exclusivamente en la técnica anterior, es que los efectos de la expresión de un gen sólo podían controlarse en un tejido particular, que en el caso del promotor de albúmina era el hígado. Los profesionales de la técnica anterior no se desanimaron por esta limitación, porque el hígado se consideraba generalmente que era el único tejido importante para estudiar el metabolismo de los fármacos y por lo tanto sólo se deseaba la expresión en el hígado. La expresión en cualquier tejido que no fuese el hígado se observó como falsa y por lo tanto como un impedimento para un modelo eficaz en lugar de ser, de alguna manera, ventajosa. Otro inconveniente de los sistemas de la técnica anterior basados en el uso del promotor de albúmina era que para el sistema funcionase, se requería un fondo nulo PXR murino. Esto significa que el PXR no se expresa en ninguna parte que no sea el hígado a partir del transgen, que tiene efectos que varían muy ampliamente sobre el metabolismo de los fármacos; de manera que un ratón ya no refleja la distribución tisular natural de un ratón natural.

Los autores de la presente invención opinan que el hígado no es el único tejido importante para el metabolismo de fármacos. Por consiguiente, lo que los profesionales de la técnica anterior percibían como una ventaja, es decir que la expresión específica exclusiva en el hígado permitía una valoración precisa de la situación fisiológica real, los autores de la presente invención lo ven como una desventaja distinta porque se ignoran otros tejidos posiblemente importantes. La invención permite obtener una panorámica holística, global del proceso del metabolismo de los fármacos.

El uso del promotor endógeno conlleva también otras ventajas. En particular, se conserva la fidelidad de la expresión del desarrollo. Mientras que los sistemas de la técnica anterior han usado promotores específicos de hígado que amparan la expresión hepática exclusivamente, el uso del promotor endógeno natural garantiza que la proteína se exprese en los tejidos en los cuales se produce de manera natural y no sólo en el animal adulto sino también en cada etapa del desarrollo. Esto también conlleva la ventaja de que los animales transgénicos son probablemente más viables y por tanto útiles como exploraciones en fármacos y en el desarrollo de cruzamientos cadena bajo. También permite que los animales se usen para explorar los efectos teratogénicos de un compuesto de ensayo, ya que se conserva la expresión de los factores de transcripción placentarios y las enzimas metabolizantes de fármacos.

Adicionalmente, los autores de la presente invención también han observado la existencia de un efecto de "represión" potencial mediante el cual un compuesto farmacológico particular reduce el nivel de un transportador o de una enzima metabolizante de fármacos en particular y modifica de esta forma la tasa o ruta de disposición. Por ejemplo, cuando los niveles del CYP3A4 humano disminuyen, como resultado, por ejemplo, de una represión del PXR de ratón en lugar del compañero del factor de transcripción humano convencional, entonces una ruta de disposición alternativa puede desproporcionarse. Esto proporcionaría una impresión engañosa de los niveles de enzima que se inducen mediante un fármaco particular en un organismo. Esto también proporcionaría una impresión engañosa de la tasa y tipo de metabolismo que podría funcionar en el ser humano sobre la exposición a un fármaco particular. Los autores de la presente invención también han observado que la duración de la expresión inducida por un fármaco particular es de gran importancia. Por ejemplo, algunos fármacos que son candidatos para su uso en seres humanos pueden no metabolizarse eficazmente en los ratones. Esto significa que dicho fármaco permanece presente a una concentración sistémicamente alta durante un periodo significativo. Esto significa que los factores de transcripción tales como PXR permanecerán activados durante este periodo, activándose constantemente durante este periodo. Como resultado, niveles asociados de enzimas metabolizantes de fármacos, transportadores de fármacos y otras enzimas de este tipo también se expresarán a niveles muy altos durante todo el periodo en el que el fármaco permanezca en el animal. Esto es claramente engañoso y en contraste con la situación equivalente en el ser humano en el que el metabolismo del fármaco puede ser significativamente más eficaz.

El uso del promotor humano en lugar del promotor de ratón puede preferirse para dirigir la expresión de los factores de transcripción, enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1, enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2 y/o transportadores de fármacos ya que esto permite conservar las idiosincrasias del sistema de expresión humano. De nuevo, usando el ejemplo de los genes CYP3A de ratón, estos tienen un número diferente de elementos de respuesta PXR y CAR con respecto al número que está presente en el gen CYP3A4 humano. Cuando se usa el promotor de ratón equivalente, entonces la respuesta a la activación transcripcional de PXR mediante la exposición del animal al fármaco sería correspondientemente diferente a la respuesta que es equivalente en un sistema humano. Esto es también cierto ya que en muchos casos, el beneficio de usar el promotor humano es que no existe un ortólogo de ratón verdadero. Por tanto esto conduciría a una mayor o menor producción de la proteína metabolizante de fármaco en respuesta a un fármaco en particular, exagerando así posiblemente o disminuyendo la función de esa proteína en el metabolismo de ese fármaco. Por ejemplo, en un sistema de ratón particular conocido

en la técnica anterior, esto puede deberse a niveles de expresión inapropiadamente altos de CYP3A4, dirigido por un promotor inapropiado, el fármaco ensayado se metaboliza muy rápidamente como para que sea evidente cualquier efecto posiblemente beneficioso. Esto por supuesto conduce a engaño.

5 Por el contrario, el uso del promotor humano natural significa que, siguiendo este ejemplo, se produciría la cantidad apropiada de CYP3A4 en respuesta a la activación del fármaco y adicionalmente se produciría en el tejido correcto. La respuesta fisiológica natural a un fármaco en particular se copiará después, en cuanto a la cantidad de CYP3A4 que se produce, no sólo en el hígado, sino también, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal. Si el fármaco es en efecto un sustrato para CYP3A4, entonces se metabolizará a una tasa y de una manera que refleje la situación en el ser humano. Por el contrario, un procedimiento de la técnica anterior que usa un promotor de albúmina para dirigir la expresión de cantidades inapropiadamente grandes de CYP3A4 distorsionaría la función de esta proteína y conduciría a resultados engañosos. Por ejemplo, el fármaco podría ser en efecto solo un sustrato débil para CYP3A4 pero sin embargo se metabolizaría agresivamente si estuviesen presentes grandes cantidades de la proteína.

Como resultado, la proteína humana se produce en el lugar correcto en el momento correcto. Esto confiere realismo al modelo que simplemente no poseen los sistemas de la técnica anterior.

### 15 **Construcciones preferidas**

En algunas circunstancias; el gen diana y el gen humano incorporado pueden compartir una secuencia líder. Esto puede conseguirse conservando al menos un intrón en la construcción, lo que normalmente da como resultado una mejor expresión. Esta estrategia también garantiza que el producto génico se conducirá a una localización intracelular correcta. La secuencia líder humana también podría cumplir esa función, pero a menudo es más seguro usar en su lugar la secuencia líder de ratón. Por ejemplo, en el caso de MRP2, la "secuencia líder" de la proteína de ratón, codificada por el exón 1, puede conservarse. El ADNc humano sin secuencias desde el exón 1 se introduce después en el exón 2 de la secuencia genómica de ratón. Los sitios de corte y empalme originales para el intrón 1 de ratón se conservarán, de manera que esta construcción codifique una proteína de fusión de aminoácidos del exón 1 de ratón y los exones 2-32 humanos. Esta construcción garantiza un alto nivel de expresión y también que el MRP2 se guie a su correcta localización, la membrana plasmática.

En otros casos, el gen humano incorporado puede ponerse bajo el control del promotor del gen del animal diana apropiado. Por ejemplo, en el caso de MDR1, el ADNc del MDR1 humano puede fusionarse con el sitio de inicio de la traducción de los genes de ratón correspondientes (*Mdr1a* o *Mdr1b*). En el ejemplo de PXR, puede fusionarse un híbrido de ADNc de PXR humano y secuencias genómicas con el sitio de inicio de la traducción del gen PXR de ratón, por lo cual se conserva el codón ATG de inicio. En el caso de CAR, la secuencia humana puede fusionarse con el sitio de inicio de la traducción del gen CAR de ratón.

### Ratones transgénicos

En realizaciones preferidas de la presente invención, como ha descrito anteriormente y se indicará a continuación, el animal transgénico no humano y tejidos o células derivados del mismo es un ratón.

35 Aunque el uso de animales transgénicos plantea cuestiones de naturaleza ética, se considera que el beneficio para el ser humano de los estudios de los tipos descritos en el presente documento supera ampliamente cualquier sufrimiento que pudiera imponerse en la creación y el ensayo de animales transgénicos. Como será evidente para los expertos en la materia, no puede prescindirse de las terapias farmacológicas que requieren ensayos con animales, antes de que los estudios clínicos puedan iniciarse en los seres humanos y bajo regulaciones habituales y con sistemas de modelos actualmente habituales.

45 El objeto de la invención es reducir el grado de desperdicio en el descubrimiento de fármacos. Siempre que un fármaco fracase en una fase tardía en el ensayo, en un sentido, todos los experimentos con animales no habrán servido para nada. Por lo tanto la suspensión de fármacos que fracasan salvan las vidas de los animales de ensayo. Por lo tanto, aunque la presente invención se refiere a un animal transgénico el uso de dichos animales debe reducir la cantidad de animales que deben usarse en programas de ensayo de fármacos.

50 Una ventaja de la presente invención es que evita problemas de divergencia de especies entre el ser humano y otros mamíferos que se han usado convencionalmente con modelos de ensayo. Un ejemplo lo proporciona la familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), para la que en el pasado se desarrollaron diversos fármacos como agentes hipolipidémicos. El desarrollo de estos fármacos se suspendió, ya que, en modelos de ratón, se identificó que eran carcinógenos epigenéticos. Finalmente resultó que la toxicidad entre especies podía atribuirse a diferencias en niveles de PPAR $\alpha$  en el hígado. El fenómeno aparente en el ratón no se produce en seres humanos, debido a los bajos niveles de proteína PPAR $\alpha$  que están presentes en el hígado. Existen ventajas muy claras con respecto a los modelos que presentan niveles de expresión de proteínas auténticas que reflejan los niveles que están presentes en el organismo humano.

55 Preferentemente, cada una de las secuencias de ADN humano están unidas independientemente a secuencias de ADN reguladoras de seres humanos y animales no humanos (por ejemplo el promotor endógeno humano o no humano). Esta unión es distinta de la de la técnica anterior y proporciona la ventaja de mejorar, sobre modelos de la

técnica anterior, dado que adicionalmente propone el reflejo de una situación humana *in vivo*.

Una ventaja particular de los ratones transgénicos humanizados, células y tejidos, de la presente invención, es que combina los beneficios de los modelos animales experimentales normales con aquellos de cultivos de células o tejidos humanos en sólo sistema. Este sistema o animal transgénico humanizado proporcionará a la industria farmacéutica una alternativa mejorada para su uso en todos los estudios preclínicos de metabolismo, toxicidad y disposición de fármacos.

### Células

Otro aspecto de la presente invención se refiere a células, modificadas para poseer propiedades de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriormente descritos de la invención. Los hepatocitos y las células neuronales son los tipos de células preferidos de acuerdo con la presente invención. Las células son células de ratón.

Las células, de acuerdo con este aspecto de la invención, pueden crearse a partir de ratones transgénicos de acuerdo con la invención usando técnicas convencionales, como será obvio para el experto lector, impregnado con el conocimiento de la presente invención. En muchos manuales de laboratorio se describen procedimientos adecuados convencionales tales como Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Sambrook *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Tercera Edición (2000); Ausubel y col., 1991 [citado anteriormente]; Spector, Goldman & Leinwald, 1998).

En un aspecto, dichas células pueden ser células de ratón, generadas de acuerdo con cualquiera de los aspectos antes descritos de la invención. Un procedimiento preferido de generación de dichas células es cruzar un ratón humanizado, como se ha descrito anteriormente, con un ratón inmortalizado SV40 (por ejemplo, el ratón inmortal (Taconix)). Después, las células pueden aislarse de dichos animales, de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia. A diferencia de los sistemas transgénicos de la técnica anterior, que usaron el promotor de albúmina que solo es activo en el hígado y por tanto sólo es capaz de generar hepatocitos, las células de los ratones transgénicos generadas de acuerdo con la presente invención pueden ser de una selección diversa de diferentes tipos celulares, incluyendo células de importancia significativa para análisis farmacocinéticos, tales como hepatocitos y células neuronales.

Las células madre aisladas de ratones transgénicos, de acuerdo con la invención, con las propiedades como se ha descrito anteriormente, son también aspectos útiles de la presente invención. Dichas células pueden ser pluripotentes, o pueden estar parcialmente diferenciadas. Las células madre pueden ser células madre adultas o células madre embrionarias. Más generalmente, las células madre empleadas pueden proceder de un estado de desarrollo post-embrionario, por ejemplo fetal, neonatal, juvenil o adulto. Las células madre aisladas de esta manera pueden usarse para generar tipos específicos de células tales como hepatocitos y células neuronales. Dichas células también forman un aspecto de la presente invención.

### Selecciones preferidas de genes reemplazados

La invención también describe un ratón, tejido o células derivados del mismo que incorpora:

- (i) al menos una secuencia de ADN humano que codifica un factor de transcripción; y
- (ii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos;

y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado.

Los autores de la presente invención consideran que, en el caso de modelos de metabolismo de fármacos, es importante generar ratones que no sean sólo transgénicos para enzimas metabolizantes de fármacos particulares, sino que también incorporen en estos modelos, proteínas que sean transportadoras de fármacos, es decir, proteínas transportadoras de fármacos. Por ejemplo, muchos compuestos que activan el PXR, el factor de transcripción nuclear, son también sustratos para MDR1 y por tanto se transportan fuera de las células mediante esta proteína. Por lo tanto, para crear un modelo fiel de la situación *in vivo*, los ratones deben ser preferentemente transgénicos para las proteínas transportadoras de fármacos, de otra manera se obtendría una impresión errónea de los efectos intracelulares de cualquier concentración de fármaco particular. De las proteínas transportadoras de fármacos, la MDR1 es la preferida. En el caso de modelos de ratones transgénicos de la técnica anterior, por supuesto, la redundancia de transportadores de fármacos que se genera por la presencia de *mdr1a* y *mdr1b* genera resultados erróneos y por tanto preferentemente, ambos genes de ratón deben inactivarse y reemplazarse con el gen *mdr1* humano.

La expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de fármacos, tales como MDR1, está también activada por el sistema de señalización basado en PXR. Por consiguiente, como la expresión de los genes de fase I, fase II y transportadores de fármacos está asociada a PXR, además del hecho de que los productos de estos genes tengan diversos efectos sobre los niveles y el metabolismo de los fármacos y sus metabolitos, la integridad de una regulación coordinada que se mantenga de acuerdo con la presente invención es extremadamente ventajosa, particularmente cuando se compara con los sistemas de la técnica anterior.

Además, la proteína MDR se expresa en un grado significativo en el tracto gastrointestinal (GI) y en el entrono de la barrera hematoencefálica. Dado que tanto el tracto GI como la barrera hematoencefálica son fuentes significativas de transporte de fármacos en la corriente sanguínea, la presencia de niveles de expresión de MDR fisiológicamente relevantes confiere un aspecto importante de los procesos del metabolismo de fármacos al modelo de fármacos y en la demostración de la actividad farmacológica. La presencia de MDR en el tracto GI, por ejemplo, puede hacer que el fármaco administrado por vía oral no esté biodisponible. La MDR es muy importante para el transporte de fármacos tanto dentro como fuera del cerebro. La MDR también transporta fármacos desde células somáticas en el hígado dentro de la bilis.

A continuación se enumeran otras combinaciones preferidas de genes del metabolismo de fármacos.

- 10 La invención también describe un ratón, tejidos o células derivados del mismo, que incorpora:
- (i) al menos una secuencia de ADN humano que codifica un factor de transcripción; y
  - (ii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; y/o
  - (iii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos;

y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado.

- 15 La invención también describe un ratón, tejidos o células derivados del mismo, que incorpora:
- (i) al menos una secuencia de ADN humano que codifica un factor de transcripción; y
  - (ii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o
  - (iii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos;

y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado.

- 20 La invención también describe un ratón, tejidos o células derivados del mismo, que incorpora:
- (i) al menos una secuencia de ADN humano que codifica un factor de transcripción;
  - (ii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1;
  - (iii) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2;
  - (iv) al menos una secuencia de ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos;

- 25 y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado.

Preferentemente, en este aspecto incluye una cualquiera o más de las características descritas anteriormente en el presente documento.

- 30 La invención también describe un ratón, o tejidos o células, derivados del mismo que incorpora secuencias de ADN humano que codifican un PXR y un factor de transcripción CAR y al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y al menos una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y al menos una secuencia de ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos, en el que en el animal no humano, tejidos o células del mismo, los genes equivalentes endógenos se han anulado.

La invención también describe un ratón, o tejidos o células derivados del mismo, que incorpora:

- 35
- (i) una secuencia de ADN que codifica un PXR y/o un factor de transcripción CAR;
  - (ii) una secuencia de ADN que codifica la enzima CYP3A4; y
  - (iii) una secuencia de ADN que codifica humana que codifica la proteína MDR1.

- 40 Este aspecto de la invención es de utilidad particular ya que la enzima CYP3A4 es de particular importancia en el tracto GI y por lo tanto un animal humanizado para esta isoforma será de importancia en la investigación de la función del metabolismo de fármacos en la biodisponibilidad de los fármacos en el intestino. Además, como se ha expuesto anteriormente, se sabe que la proteína MDR1 se expresa en la barrera hematoencefálica y cuando se incorpora en el ratón humanizado descrito anteriormente proporcionará una situación verdaderamente representativo de la captación de fármacos/ sustancias xenobióticas dentro y fuera del cerebro en el hombre.

La invención también describe un ratón, o tejidos o células derivados del mismo, que incorpora:

- 45
- (i) una secuencia de ADN humano que codifica un PXR y/o un factor de transcripción CAR;
  - (ii) una secuencia de ADN humano que codifica la enzima CYP3A4;
  - (iii) una secuencia de ADN humano que codifica la enzima UGT1A; y
  - (iv) una secuencia de ADN humano que codifica la proteína MDR1.

Otras combinaciones preferidas incluyen combinaciones de un PXR y/o un factor de la transcripción CAR, una secuencia de ADN humano que codifica la proteína MDR1 y uno o más de: CYP2A9, el grupo CYP3A, el grupo CYP2C y UGT o el grupo UGT0.

**Procedimientos para introducir genes de reemplazo**

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para introducir al menos un factor de transcripción humano funcional en una célula de ratón cuyo propio gen (o genes) equivalente endógeno que expresa la proteína antes citada, se ha vuelto inactivo, incorporando adicionalmente la célula de ratón derivada del mismo al menos uno o más de las siguientes secuencias de ADN humano seleccionadas del grupo que comprende:

- 10 (i) una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1;
- (ii) una secuencia de ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o
- (iii) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos

15 y cuyos propios genes endógenos equivalentes que expresan las proteínas antes citadas se han vuelto inactivos; comprendiendo el procedimiento la introducción de los ADN que codifican dicho factor de transcripción humano, dicha enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y 2 y/o dicha proteína transportadora de fármacos de tal manera que dichos productos de expresión humanos permanecen funcionales donde los propios genes endógenos de la célula de ratón se han vuelto inactivos y en el que los genes de ratón cuyos productos proteicos son análogos a los productos proteicos de las secuencias de ADN humano introducidas se suprimen bien por direccionamiento directo con sus homólogos humanos o bien flanqueando estos genes o grupos génicos con sitios de reconocimiento y posterior supresión mediada por una recombinasa, de tal manera que la secuencia de ADN humano se inserta en el punto en el genoma en el que existe de modo natural el gen endógeno equivalente; y en el que la célula se humaniza para los PXR y CAR individualmente o en combinación.

20 De acuerdo con la presente invención los genes endógenos no humanos, cuyos productos proteicos son análogos a los productos proteicos de las secuencias de ADN humano introducidas, están suprimidos. Esto puede realizarse preferentemente por direccionamiento directo con sus equivalentes humanos o flanqueando estos genes o grupos génicos con sitios de reconocimiento y posterior supresión mediada por una recombinasa.

25 De acuerdo con la presente invención, los genes que se insertan en el modelo transgénico se insertan en el punto en el genoma en el que el gen, o grupo génico, equivalente endógeno existe de modo natural. Esto tiene la ventaja de que se conserva el contexto del locus génico lo que significa que la fidelidad de transcripción a partir de este sitio es tan estrecha como sea posible con respecto al nivel de transcripción que se produce en el sistema de tipo silvestre.

30 Adicionalmente, de acuerdo con la invención, el gen o genes equivalentes endógenos, con respecto a los que se insertan en el sistema transgénico, se han anulado. "Anulado" significa incluir silenciamiento o supresión o volverse inactivo, de tal manera que el gen equivalente endógeno del animal no humano no pueda expresar el producto (o productos) génico. Una manera preferente en la que se anule la expresión del gen o genes equivalentes endógenos y simultáneamente se inserte el gen de reemplazo en el punto en el cual existe de modo natural es mediante el proceso de recombinación homóloga, descrito anteriormente. De acuerdo con esta metodología, brazos de homología de secuencia complementarios a sitios en el genoma diana flanquean la secuencia de inserción y estos se usan para dirigir la inserción del gen o genes humanos deseados.

35 Por ejemplo, en el caso de MDR1, la proteína transportadora de fármacos, diferente en especies animales, tiene isotipos de MDR1 y perfiles de expresión diferentes. El ratón tiene dos genes que codifican transportadores de fármacos activos (MDR1a y MDR1b), cuya expresión tisular es mutuamente exclusiva. Por el contrario, MDR1 es el único transportador de fármacos de los dos genes MDR presentes en el ser humano (MDR1 y MDR3) que funciona. Por lo tanto, cuando se crea un ratón transgénico para MDR, el MDR1 debe reemplazar preferentemente ambos genes MDR endógenos, MDR1a y MDR1b.

40 Otro ejemplo puede proporcionarlo el caso de CYP2D6, en el que hay nueve genes en el ratón, correspondientes a un sólo gen funcional en seres humanos. Sin embargo, el reemplazo del grupo génico de ratón con el gen humano es relativamente sencillo, ya que el último abarca menos de aproximadamente 40 kb de la secuencia genómica.

45 Las secuencias de ADN pueden suprimirse, por ejemplo, mediante supresiones mediadas por Cre/lox. Este tipo de supresión es adecuado para suprimir fragmentos grandes de ADN (de 200 kb a varias megabases). El procedimiento se ha descrito en los siguientes documentos (Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U, Weissmann C. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells Proc Natl Acad Sci U S A. 11 jun 1996; 93(12): 6158-62. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 15 oct 1996; 93(21): 12052 y en Su H, Wang X, Bradley A. Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice. Nat Genet. 24 ene 2000; 24(1): 92-5).

Las inserciones mediadas por Cre/lox de grandes fragmentos también pueden usarse para insertar secuencias de ADN humano mediante un procedimiento descrito en Call LM, Moore CS, Stetten. G, Gearhart JD. Un sistema de recombinación cre-lox para la integración dirigida de cromosomas artificiales de levadura circulares en células madre embrionarias. Hum Mol Genet. 2000 Jul 22; 9(12): 1745-51.

- 5 Preferentemente, el ratón transgénico se humaniza para una proteína transportadora de fármacos mediante la estrategia de genosustitución, no descrita en el presente documento, como se muestra en la representación esquemática de las Figuras 1, 2 y 3 adjuntas.

El ratón transgénico de la presente invención se humaniza para PXR y CAR individualmente o en combinación, más preferentemente en combinación.

- 10 Preferentemente, los genes humanos se conservan, al menos parcialmente, dentro de una construcción.

Preferentemente, en el caso de un ratón transgénico que exprese el gen PXR humano, la construcción PXR conserva la estructura intrón-exón entre los exones 4 y 6. Esta conserva ventajosamente la secuencia en la que la se observa la mayoría de las variantes de corte y empalme y se localiza convenientemente dentro del dominio de unión a ligando. La secuencia PXR humana preferida por lo tanto contiene el ADNc de los exones 1-4, las secuencias genómicas del intrón 4, el exón 5 e intrón 5 y el ADNc para los exones 6-9.

- 15

Se apreciará que los productos de corte y empalme alternativos entre estos exones, que podrían determinar proteínas con distinta capacidad de unión a ligando, quedarán incluidos en las construcciones de la presente invención.

- 20 Preferentemente, la construcción CAR conserva la estructura intrón-exón entre los exones 2 y 9. Esto conserva ventajosamente la estructura genómica completa dentro del vector diana y permite incluir todas las variantes de corte y empalme de la proteína CAR humana.

Anteriormente se han descrito otras construcciones preferidas.

- 25 En una realización de la invención el ratón transgénico se produce de *novo* para incluir todas las características anteriormente mencionadas por procedimientos mediante los cuales, se consigue, por ejemplo, la supresión mediada por cre/lox de grandes fragmentos de ADN ( de 200 kb a diversas megabases) (Li ZW, y col. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells Proc Natl Acad Sci USA. 11 jun 1996; 93 (12):6158-62 Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Oct 15; 93(21):12052 y en Su H y col. Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice. Nat Genet. Ene 2000; 24(1):92-5), y en el que las inserciones mediadas por cre/lox de grandes fragmentos se consiguen como se describe en Call y col. A cre-lox recombination system for the targeted integration of circular yeast artificial chromosomes into embryonic stem cells. Hum Mol Genet. 22 jul 2000; 9 (12):1745-51.

- 30

En otra realización de la invención el ratón transgénico de la presente invención se produce por cruzamiento. Por ejemplo, el animal del documento WO 2004/007708 pudo cruzarse con aquellos animales transgénicos que se han humanizado con PXR y /o CAR e incluían modificaciones adicionales con respecto a las enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2 y proteínas transportadoras de fármacos en cualquier cepa transgénica del ratón.

- 35

En una realización adicional de la invención el ratón transgénico se produce *de novo* para incluir todas las características anteriormente mencionadas, mediante procedimientos tal y como se describe en lo sucesivo en el presente documento.

- 40 Deberá apreciarse que, de manera ideal, todos los ADN humanos introducidos se encuentran sustancialmente bajo el control de promotores humanos.

### Sistemas de modelos

- 45 Ventajosamente, la presente invención proporciona un ratón transgénico que mimetiza los mecanismos del metabolismo humano, la disposición o toxicidad de fármacos o de otros compuestos xenobióticos en una célula de ratón introduciendo en una célula de ratón una o más secuencias de ADN humano que comprenden secuencias codificantes y reguladoras necesarias para reproducir la regulación y función de una o más proteínas responsables del metabolismo humano, disposición o toxicidad de fármacos o de otros compuestos xenobióticos, en los que la célula de ratón experimenta supresión de genes endógenos que codifican proteínas cuyas funciones son análogas a las codificadas por las secuencias de ADN humano introducidas de tal manera que la célula de ratón puede usarse como un sistema modélico para determinar el metabolismo, la disposición o toxicidad de fármacos o de otros compuestos xenobióticos en una célula humana homóloga.

- 50

De acuerdo con la invención, es posible "personalizar" un sistema transgénico particular para adaptar un fenómeno que sea digno de investigación. Por ejemplo, los niveles de expresión del gen CYP3A4 pueden variar tanto como 60 veces entre individuos y en cualquier individuo también puede variar con el tiempo. Esto se debe en parte a las diferencias genéticas intrínsecas, pero lo que es más importante, se debe a la variabilidad en la exposición a

fármacos, toxinas, productos alimenticios u otras variables ambientales. El sistema es un sistema de respuesta adaptativo en el que solo se mantendrá altos niveles enzimáticos durante el tiempo que se necesiten. Cualquier otra implementación no sería rentable. Esto significa que generalmente no es apropiado, en ningún sistema de ensayo, ensayar exclusivamente el efecto de una concentración de fármaco particular a un nivel de CYP3A4. Los efectos del fármaco deben evaluarse idealmente a altos niveles de CYP3A4 y también a bajos niveles de CYP3A4 de manera que la respuesta se ensaye un entorno tanto alto como bajo de P450. Por supuesto, sistemas de acuerdo con la técnica anterior, usando el promotor de albúmina, simplemente no puede reflejar la situación real encontrada *in vivo*.

Otro ejemplo lo proporciona la proteína CYP2D, que desempeña una función principal en el metabolismo de fármacos neurolépticos (por ejemplo antidepresivos y fármacos usados para el tratamiento de la esquizofrenia) y es por tanto de importancia significativa. Las compañías farmacéuticas son reacias a apoyar a fármacos que se metabolizan por CYP2D6 y por lo tanto necesitan saber, tan rápidamente como sea posible, durante el desarrollo de cualquier fármaco, si la proteína CYP2D6 es o no fiable. Este gen muestra variación entre individuos, y de hecho la expresión no existe aproximadamente en el 6 % de los individuos caucásicos. Sería de inmenso beneficio poder estudiar el metabolismo de fármacos, particularmente de antidepresivos, en entornos de niveles de CYP2D6 tanto altos como bajos.

Estas ventajas también permiten realizar ensayos de carcinogenicidad así como los ensayos farmacológicos intensos descritos anteriormente. Por ejemplo, de acuerdo con la invención, pueden generarse niveles de P450, como genes simples o como genes múltiples y preferentemente como grupos génicos, a niveles artificialmente altos para ensayar los posibles efectos carcinogénicos de los metabolitos. A niveles fisiológicamente normales, los efectos de dichos metabolitos podrían no manifestarse. La notable diferencia de especies en carcinogenicidad de compuestos entre roedores y humanos da como resultado principalmente diferentes tasas de generación de metabolitos tóxicos o mutagénicos, junto con otras diferencias en farmacocinética y distribución. La capacidad de aumentar niveles génicos en grupos enteros es importante ya que se conserva la interferencia de sustratos entre las diferentes proteínas expresadas por los genes en el grupo.

Para investigar enfermedades también pueden aprovecharse sistemas personalizados de este tipo. Un ejemplo lo proporciona el síndrome de Gilbert, un fenómeno producido por un polimorfismo en el gen UGT1A1 implicado en el metabolismo de fármacos. De acuerdo con la invención, un animal de modelo transgénico puede incorporar el gen que contenga el polimorfismo para permitir que este síndrome se evalúe.

De acuerdo aún con otro aspecto de la invención se describe una célula huésped transfectada con una construcción (o construcciones) de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos previos de la invención.

De acuerdo aún con otro aspecto de la invención, se describe un ratón transgénico en el que las células del animal expresan la proteína (o proteínas) codificada por la construcción (o construcciones) de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos previos de la invención. El animal transgénico es un ratón.

En realizaciones de la invención con respecto a la preparación de una célula huésped transgénica o un ratón transgénico que comprenden el uso de una construcción de ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente, la célula o el ratón pueden someterse a transgénesis adicional, en la que la transgénesis es la introducción de un gen o genes adicionales o secuencias o secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas. La transgénesis puede ser transfección transitoria o estable de una célula o una línea celular, un sistema de expresión episomal en una célula o una línea celular, o preparación de un animal no humano transgénico por microinyección pronuclear, a través de eventos de recombinación en células madre (ES) no embrionarias, transgénesis aleatoria en células madre (ES) embrionarias no humanas o por transfección de una célula cuyo núcleo va a usarse como un núcleo donante en un procedimiento de clonación de transferencia nuclear.

Los procedimientos para preparar una célula o línea celular transgénica, o un ratón transgénico, en el que el procedimiento comprende la transfección transitoria o estable de una célula o una línea celular, la expresión de un sistema de expresión episomal en una célula o línea celular, o microinyección pronuclear, eventos de recombinación en células ES, u otra línea celular, o por transfección de una línea celular pueden diferenciarse en diferentes rutas de desarrollo diferenciadas y cuyo núcleo va a usarse como donante para transferencia nuclear; en el que la expresión de una secuencia de ácido nucleico o construcción adicional se usa para explorar la transfección o transgénesis de acuerdo con los aspectos previos de la invención. Los ejemplos incluyen el uso de marcadores de selección que confieren resistencia a antibióticos añadidos al medio de cultivo de las células, por ejemplo el marcador de resistencia a neomicina que confiere resistencia a G418. Los ejemplos adicionales implican la detección usando secuencias de ácido nucleico que son de secuencia complementaria y que se hibridarán con, o con un componente de, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con los aspectos previos de la invención. Los ejemplos incluirían análisis por transferencia de Southern, análisis por transferencia de Northern y PCR.

Las células de ratón o los animales producidos por el procedimiento de la invención pueden usarse como sistemas de modelo para determinar el metabolismo de fármacos o de otros compuestos xenobióticos en un ser humano.

De acuerdo aún con un aspecto adicional de la invención se describe el uso de un ratón transgénico, tejidos y/o células derivadas del mismo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que se han modificado

5 para contener y expresar ADN que codifique al menos un factor de transcripción humano funcional, al menos una enzima metabolizante de fármacos de fase 1, al menos una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y al menos una proteína transportadora de fármacos para investigar el metabolismo de compuestos xenobióticos o la toxicidad en el ratón transgénico, tejidos y/o células derivados del mismo u otras propiedades o funciones de las proteínas humanas introducidas tales como el metabolismo y/o la biosíntesis de compuestos endógenos.

El sistema de la presente invención permite estudiar la función y la regulación de mecanismos humanos del metabolismo, la disposición y la toxicidad de compuestos xenobióticos, en cualquier tejido o tipo de célula, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal, la barrera hematoencefálica, el hígado, el riñón en un solo animal, tejido o células derivados del mismo.

10 El sistema de la presente invención puede aplicarse para estudiar los efectos del metabolismo humano, disposición o toxicidad sobre efectos antitumorales de un fármaco en un experimento animal de xenoinjerto expresando rutas metabólicas humanizadas en una línea celular tumoral injertada no humana y/o en el animal huésped.

#### Indicadores

15 De manera ventajosa, la presente invención también describe células de ratón y ratones transgénicos que incorporan genes indicadores introducidos de tal manera que dichas células o animales pueden usarse para determinar indicaciones de rutas del metabolismo de fármacos o de otros compuestos xenobióticos en una célula humana mediante un ensayo conveniente de los productos de la expresión del gen indicador.

20 Cuando los genes indicadores se han incorporado en células las del ratón o en los ratones transgénicos producidos por el procedimiento de la invención (véase a continuación), las células o los animales pueden usarse para determinar la regulación de genes y también proporcionar indicaciones de los probables mecanismos y metabolismo de fármacos u otros compuestos xenobióticos en una célula humana homóloga sometiendo a ensayo la expresión de la secuencia de ADN del gen indicador. Las células o animales también pueden usarse para proporcionar indicaciones del grado del metabolismo de fármacos u otros compuestos xenobióticos. Por ejemplo, el análisis de la distribución de la expresión del gen indicador dentro de cualquier tejido particular permite que se controle el grado de inducción de la expresión de genes en respuesta a un compuesto farmacológico particular.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se describe un animal no humano, o tejidos o células derivadas del mismo, que incorporan un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humano que codifica

- (i) un factor de transcripción; y
- 30 (ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; y/o
- (iii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o;
- (iv) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos.

35 Por tanto, el promotor del factor de transcripción y/o la enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y/o fase 2 y/o la proteína transportadora de fármacos pueden estar unidos a un indicador que permita controlar la regulación relativa de al menos una enzima implicada en la disposición fármaco/sustancia xenobiótica. De maneja ventajosa, dicha realización no solo permite la regulación relativa de las enzimas sino la regulación, de una manera específica de tejido, en el animal transgénico o en el propio animal completo de una manera no invasiva así como el grado y fuerza de inducción génica. Los indicadores pueden unirse a los promotores de dos o más de los puntos (i), (ii), (iii) o (iv) indicados anteriormente.

40 Los genes indicadores son secuencias de ácido nucleico que codifican directa o indirectamente proteínas evaluables. Estos se usan para reemplazar otras regiones codificantes cuyos productos proteicos no son adecuados o no pueden manipularse para el ensayo en cuestión. Los genes indicadores adecuados, conocidos en la técnica, y que pueden usarse en la presente invención se seleccionan de aquellos genes que codifican proteínas que incluyen, pero sin limitación: cloranfenicol-acetiltransferasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, luciferasa, beta-galactosidasa, proteína fluorescente verde, fosfatasa alcalina secretada (SEAP), proteína urinaria mayor (MUP) o la gonadotropina coriónica humana (hCG). Se entenderá que la lista anterior de genes indicadores adecuados no es exhaustiva o exclusiva y no pretende limitar el alcance de la solicitud. El experto en la materia puede seleccionar otro sistema indicador que también será aplicable a la presente invención.

50 De acuerdo con la invención, los promotores que son dianas preferidas para la unión a genes indicadores son PXR, CAR, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP2B6, UGT1A, MRP2 y MDR1.

Los animales, tejidos y células de acuerdo con estos aspectos de la invención permiten aclarar elementos muy útiles de los procesos de la regulación de genes en el metabolismo de fármacos. Por ejemplo, aunque se sabe que PXR tiene gran importancia en el control transcripcional del gen CYP3A4, probablemente hay otros mecanismos activos importantes. La exposición de un animal o célula con indicador CYP3A4 a un compuesto farmacológico en un PXR



humanizado o fondo nulo PXR, sería útil en la exploración de otras formas de regulación de CYP3A4 que mediante PXR. Otro caso de interés sería exponer un animal o célula con indicador *mdr1* a un compuesto farmacológico en un PXR humanizado y fondo nulo PXR para detectar aspectos de la expresión de *mdr1* que son independientes de la regulación de PXR.

- 5 Por consiguiente, los ratones, tejidos y células de acuerdo con ese aspecto de la invención pueden comprender un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humana que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos en un fondo nulo para PXR, CAR o cualquier otro factor de la transcripción. Por "fondo nulo" se entiende el gen o genes que se han anulado, de acuerdo con la
- 10 definición proporcionada anteriormente. Dichos animales, células o tejidos podrían compararse en condiciones similares (por ejemplo, en presencia y ausencia de un fármaco o fármacos) con un fondo de PXR o CAR humanizado. Por consiguiente, los animales, tejidos y células de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humana que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o una
- 15 secuencia de ADN que codifica una proteína transformadora de fármacos en un fondo humanizado para un factor de la transcripción. Tal factor de transcripción puede ser PXR individual, CAR individual, PXR y CAR o cualquier otro factor de transcripción sencillo o combinación de factores de transcripción descritos en el presente documento.

Por "unido transcripcionalmente" se entiende que la actividad del promotor dictamina el nivel de expresión de la proteína indicadora. Preferentemente, un gen indicador se fusiona con el sitio de inicio de la traducción del gen humano correspondiente cuyo promotor debe investigarse. En el caso de los promotores CYP3A4, CYP2C9 y CYP2C19, el

20 transcripto del gen indicador puede no determinarse mediante un motivo poliA, pero estas construcciones se diseñan de tal manera que el motivo PoliA endógeno se usa potencialmente. Estas construcciones por lo tanto dependen de un corte y empalme correcto de los exones 3' con respecto al indicador (véase Figura 12). En los casos de CYP2D6 y CYP2B6, el transcripto del gen indicador se determina preferentemente mediante un motivo poliA unido al gen

25 indicador con un intrón sintético (véase Figura 13). En el caso de MDR1, el transcripto del gen indicador se determina preferentemente mediante un motivo poliA sin un intrón adicional (véase Figura 14).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se describe un ratón, o tejidos o células derivadas del mismo, que incorpora al menos una secuencia de ADN humana que codifica al menos un factor de transcripción bajo control de un promotor de factor de transcripción cuyos genes equivalentes y endógenos opcionalmente se han anulado. El

30 animal no humano, tejido, células adicionalmente que incorporan un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humana que codifica:

- (i) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; y/o
- (ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o
- (iii) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos.

35 El ratón, y tejidos o células de este aspecto de la invención pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2. El animal no humano y los tejidos o células pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos. El animal no

40 humano y tejidos o células pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o una secuencia que codifica una proteína transportadora de fármacos. Ejemplos de enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1, enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2 y proteínas transportadoras de fármacos se describen en el presente documento.

En otro aspecto, por ejemplo, la actividad del promotor del gen *mdr1* puede investigarse. En este escenario, los

45 animales, tejidos y células pueden comprender un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humana que codifica un factor de transcripción, un promotor unido transcripcionalmente o una secuencia de ADN humana que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; y/o un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 en un fondo humanizado o nulo para *mdr1*.

50 De acuerdo con este aspecto de la invención se describe un ratón, tejido o células derivadas del mismo que incorpora al menos una secuencia de ADN humana que codifica al menos una proteína transportadora de fármacos bajo el control de un promotor transportador de fármacos y cuyos genes equivalentes endógenos se han anulado, incorporando al animal no humano tejido o células adicionalmente un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN humana que codifica:

- 55 (i) una secuencia de ADN que codifica un factor de transcripción; y/o
- (ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1; y/o

(iii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2.

El ratón, y tejidos o células de este aspecto de la invención pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2. El ratón y tejidos o células pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y una secuencia de ADN que codifica un factor de transcripción. El animal no humano y tejidos o células pueden incorporar un promotor unido transcripcionalmente a una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y/o una secuencia que codifica un factor de transcripción. En el presente documento se describen ejemplos de enzimas metabolizantes de fármacos de fase 1, enzimas metabolizantes de fármacos de fase 2 y proteínas de factor de transcripción adecuados.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se describe una construcción de ácido nucleico que comprende un vector diana sustancialmente como se representa en la Figura 2, Figura 3, Figura 12, Figura 13 y/o Figura 14.

Preferentemente, la construcción incluye adicionalmente la humanización y correspondiente inactivación de al menos una enzima metabolizante de fármacos de fase 1, al menos una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 y al menos una proteína transportadora en la misma construcción o en construcciones independientes adicionales.

#### Células

En otro aspecto de la invención, se produce una célula de ratón mediante cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente. En aspectos preferidos, al menos una secuencia reguladora de ADN humano asociada con el gen que codifica una proteína responsable para determinar el metabolismo humano, disposición, distribución o toxicidad de fármacos u otros compuestos xenobióticos está unida operativamente a una secuencia de ADN cuya expresión puede medirse convenientemente mediante ensayo de productos de transcripción o traducción para producir una secuencia de ADN de gen indicador que se introduce en la célula animal no humana. Esta realización proporciona relación con una o más secuencias indicadoras tales como la gonadotropina coriónica humana (hCG).

#### Ensayos

Los ratones, tejidos y células de la presente invención, pueden usarse para determinar cómo un ser humano metaboliza un compuesto farmacológico. En particular, es posible examinar si un compuesto farmacológico modula la actividad o niveles de expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos. Es posible examinar la proporción de los niveles de activación o expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos inducida por un compuesto farmacológico. Es posible examinar si un compuesto farmacológico ejerce influencia sobre la disposición o distribución de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos dentro de los tejidos corporales. Es posible examinar si un compuesto farmacológico ejerce influencia sobre la duración de la expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos para una proteína transportadora de fármacos.

Es posible medir un cambio fenotípico en el animal, tal como un efecto fisiológico. Tal efecto fisiológico puede ser, por ejemplo, una patología (tal como necrosis biliar) o un efecto secundario tóxico.

Es posible examinar la tasa de metabolismo de un compuesto farmacológico. La tasa de metabolismo puede determinarse midiendo la toxicidad o actividad mediada por la administración del compuesto, midiendo la semivida del compuesto o midiendo el nivel de una enzima metabolizante de fármacos. Por ejemplo, la tasa de metabolismo del compuesto puede medirse como la proporción de formación del producto oxidado o la formación de un producto posterior generado a partir del producto intermedio oxidado. Como alternativa, la tasa de metabolismo puede representarse como la semivida o tasa de desaparición del compuesto inicial o como el cambio en toxicidad o actividad del compuesto inicial o un metabolito generado a partir del compuesto inicial. La semivida puede medirse determinando la cantidad del compuesto farmacológico presente en las muestras tomadas a diversos momentos en el tiempo. La cantidad del compuesto farmacológico puede cuantificarse usando procedimientos convencionales tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, espectrometría de masas, análisis de transferencia de western usando anticuerpos específicos de compuestos o cualquier otro procedimiento apropiado.

También es posible examinar si un compuesto farmacológico se metaboliza con respecto a un metabolito tóxico o carcinogénico, por ejemplo, midiendo su unión covalente a tejidos proteínas o ADN o midiendo el consumo de glutatión.

Preferentemente, las mediciones del tipo descrito anteriormente se realizan a más de 1, 3, 5, 10, o más, momentos después de la administración del compuesto farmacológico.

Por consiguiente, otros aspectos de la invención se refieren a procedimientos de exploración que se proporcionan para determinar el efecto de un compuesto farmacológico sobre la actividad o nivel de expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos. Dichos

procedimientos implican administrar un compuesto farmacológico a un ratón transgénico, o un tejido o célula derivado del mismo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente.

5 La etapa de exploración puede implicar medir la inducción de un gen que codifica un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos. La etapa de exploración puede implicar medir el nivel de expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos o la duración de tal expresión. La etapa de exploración puede implicar medir la distribución de la expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos.

10 El ensayo puede realizarse en presencia y en ausencia del compuesto farmacológico para determinar diferencias en distribución metabolismo y toxicidad. Los efectos del compuesto farmacológico en presencia y en ausencia de un gen, o genes, en particular pueden determinarse evaluando los efectos del compuesto farmacológico sobre diferentes animales transgénicos, células o tejidos. Por ejemplo, los efectos del compuesto farmacológico podrían evaluarse entre un animal con un fondo nulo y un animal humanizado para el gen o genes de interés (por ejemplo, PXR, CAR, MDR1, una enzima metabolizante de fase 1 o una enzima metabolizante de fase 2).

15 Puede administrarse más de un compuesto farmacológico. Por ejemplo, se determina que un compuesto farmacológico activa el factor de transcripción CAR si el compuesto media la inducción del gen CAR. También puede administrarse un agonista inverso de receptores de CAR, tal como clotrimazol, a un animal que expresa el receptor de CAR humano como control. Los ensayos, de acuerdo con otros aspectos de la invención, pueden proporcionar un procedimiento de exploración para determinar si el metabolismo de un primer compuesto farmacológico se modula por un segundo compuesto farmacológico. Este procedimiento implica administrar el primer compuesto en presencia y en ausencia del segundo compuesto a un ratón transgénico, o un tejido o célula derivado del mismo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente y controlar un efecto fenotípico. Como alternativa, como se ha indicado anteriormente, la etapa de exploración puede implicar medir la inducción de un gen, el nivel, duración o distribución de la expresión de un factor de transcripción, una enzima metabolizante de fármacos o una proteína transportadora de fármacos. El segundo compuesto se determina que modula el metabolismo del primer compuesto si el segundo compuesto efectúa un cambio en cualquiera de estos factores ensayados. Por ejemplo, puede ensayarse un efecto fisiológico midiendo la toxicidad o la actividad mediada mediante la administración del primer compuesto o midiendo la semivida del primer compuesto farmacológico.

30 De esta manera, pueden usarse ensayos para facilitar la identificación de análogos de un compuesto farmacológico que tenga una capacidad reducida o no detectable para activar o inducir la expresión de una proteína particular y por tanto se espera que tenga menores efectos secundarios o una semivida más larga *in vivo*.

La invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 muestra una representación esquemática de humanización e inactivación de PXR/CAR;

35 La Figura 2 muestra una representación esquemática de ADNc complejo con secuencias genómicas para la estrategia de humanización de PXR;

La Figura 3 muestra una representación esquemática de ADNc complejo con secuencias genómicas para la estrategia de humanización de CAR;

La Figura 4 muestra un vector diana para *mdr1a* de ratón;

La Figura 5 muestra un vector diana para *mdr1b* de ratón;

40 La Figura 6 muestra la construcción para la humanización de MRP2;

La Figura 7 muestra la estrategia diana para la humanización de PXR;

La Figura 8 muestra la estrategia diana para la humanización de CAR;

La Figura 9 muestra la estrategia para la humanización de CYP3A4;

La Figura 10 muestra la estrategia para la humanización de CYP2C9;

45 La Figura 11 muestra la estrategia global para cambio de grupo;

La Figura 12 muestra la estrategia global para construcciones indicadoras;

La Figura 13 muestra la estrategia del proyecto indicador para CYP2D6 y CYP2B6;

La Figura 14 muestra la estrategia del proyecto indicador para MDR1;

La Figura 15 muestra un ejemplo de una PCR de tipificación de PXR;

5 La Figura 16 muestra una tipificación Taqman de ratones de tipo silvestre y transgénicos. Todas las sondas y cebadores usados se optimizaron previamente. Los kits de ensayo genómico TaqMan<sup>®</sup> se adquirieron en Applied Biosystems. Todos los ensayos usados se confeccionaron por Applied Biosystems. Se muestran los resultados de análisis TaqMan de hígado (A, B) e intestino delgado (C, D) de nueve ratones de tipo silvestre y de cuatro hPXR, usando ensayos específicos para la transcrita de ARNm de PXR de ratón (A, C) o el transcrita de ARNm de PXR humano (B, D);

La Figura 17 muestra una RT-PCR de transcritos de huPXR en ratones transgénicos;

La Figura 18 muestra una transferencia de Western de la proteína PXR de ratones de tipo silvestre y hPXR.

10 Las proteínas de los hígados de los ratones de tipo silvestre y huPXR tratados se exploraron con un anticuerpo específico para la proteína PXR. El patrón (+ve) era un PXR murino marcado con his;

La Figura 19 muestra una transferencia de Western de la inducción de Cyp3a y Cyp2b por rifampicina.

Las proteínas microsomales de los hígados de los ratones de tipo silvestre y huPXR tratados con rifampicina se exploraron con anticuerpos para la proteína Cyp 3a11 (panel superior) y Cyp 2b10 (panel inferior);

15 La Figura 20 muestra ensayos de actividad enzimática de la inducción de Cyp3a y Cyp2b10 por rifampicina (100 mg/kg). Se muestran los resultados de los ensayos de la actividad enzimática en microsomas hepáticos usando la actividad de pentoxiresofurin-O-desetilación (PROD) que se atribuye al nivel de expresión de Cyp 2b10 y la actividad de 7-benziloxiquinolona (BQ) que se atribuye al nivel de expresión de Cyp 3a;

20 La Figura 21 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por rifampicina (3 mg/kg y 10 mg/kg) -7-benziloxiquinolona. Se muestran los resultados de los ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos usando la actividad de 7- benziloxiquinolona;

La Figura 22 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por rifampicina (3 mg/kg y 10 mg/kg) - 6-beta hidroxilación de testosterona ( $p < 0,01$ );

La Figura 23 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por rifampicina (3 mg/kg y 10 mg/kg) - 16-beta hidroxilación de testosterona ( $p < 0,05$ );

25 La Figura 24 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por TCPOBOB (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg) – 7-alfa hidroxilación de testosterona que fue constitutivamente mayor en los animales huPXR con respecto a los de tipo silvestre;

La Figura 25 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por TCPOBOB (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg) – 6-beta hidroxilación de testosterona;

30 La Figura 26 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por TCPOBOB (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg) – 16-alfa hidroxilación de testosterona. Estos demuestra que esta actividad se indujo significativamente en animales de tipo silvestre ( $p < 0,05$ ) pero no en animales huPXR;

35 La Figura 27 muestra ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos después de inducción por TCPOBOB (0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg) – 16-beta hidroxilación de testosterona. Esto demuestra que esta actividad está mucho más marcada en los animales de tipo silvestre que en los animales huPXR;

La Figura 28 muestra confirmación PCR en dos ratones homocigotos doble-humanizados PXR/CAR en los que el gen PXR murino se ha cambiado por el homólogo humano.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: El ratón humanizado PXR/CAR**

40 El procedimiento proporciona la humanización de ratones para PXR y CAR individual o como una forma doble humanizada para cada uno de los genes (véase la Figura 1). Se han combinado estas diferentes humanizaciones mediante una transformación por etapas de células madre embrionarias (células ES, *Stem Cells*) en lugar de mediante reproducción convencional y por tanto se pueden generar células ES doble humanizadas para PXR/CAR que pueden usarse para modificaciones posteriores con secuencias de ADN humano que codifican una enzima  
45 metabolizante de fármacos de fase 1 o de fase 2, secuencias de ADN humanas que codifican una proteína transportadora de fármacos.

La aplicación de los sitios de recombinación PhiC31 permitió inactivar ambos genes cruzando el animal humanizado con una cepa supresora de Phi31.

50 A diferencia de los modelos existentes, se usa una estrategia de "genosustitución" para reemplazar los genes endógenos por sus ortólogos humanos (Figuras 2 y 3). Por lo tanto los genes PXR y CAR pueden mantenerse bajo

su contexto genómico normal y los niveles de expresión y distribución de transcritos se regula o se controla fisiológicamente, de manera ventajosa. Como resultado de esto, el modelo de la presente invención se asemejará a la situación humana de manera más fiel que las estrategias de la técnica anterior.

5 Adicionalmente, las estructuras genómicas de los genes humanos se conservan al menos parcialmente dentro de la construcción de la presente invención. En el ejemplo de PXR, se ha usado una construcción compleja de ADNc y secuencias genómicas (véase Figura 2). Debido al gran tamaño de más de 35 kb del gen PXR humano, la estructura intrón-exón se mantiene exclusivamente entre el 4 y el 6, dado que la mayoría de las variantes de corte y empalme se observan en esta región genómica ya que se localizan dentro del dominio de unión a ligando. El tamaño relativamente pequeño del CAR humano, que comprende aproximadamente 7 kb desde los exones 2-9, permite  
10 conservar la estructura genómica completa del vector diana (Figura 3).

Las células ES que comprenden PXR y/o CAR humanizados pueden modificarse adicionalmente con genes humanos que regulen las enzimas metabolizantes de fármacos (de fase 1 y 2) y/o proteínas transportadoras de fármacos. Será posible cruzar las células de animales, con PXR/CAR humanizados, con el ratón HRN, ver más adelante, o crear un animal transgénico no humano *de novo* con todos los criterios mencionados anteriormente.

### 15 **Ejemplo 2: El ratón HRN<sup>TM</sup>**

Todos los P450 necesitan reducir los electrones proporcionados por la enzima citocromo P450 reductasa (CPR). Por lo tanto, la supresión de CPR inactiva simultáneamente todos los P450. Aunque la supresión de CPR es letal en los embriones, los ratones HRN<sup>TM</sup> usan una supresión de CPR condicional regulada evolutivamente dirigida a células hepáticas post-natales. Por lo tanto los ratones HRN<sup>TM</sup> sobreviven hasta la edad adulta y pueden reproducirse aunque, sin embargo, carecen completamente de un metabolismo hepático mediado por P450 (Henderson CJ y col. J Biol Chem. 278:13480-6, 2003). Por lo tanto, proporcionan un fondo adecuado sobre el cual se expresen las actividades del P450 humano para conseguir la humanización del P450.  
20

#### **Producción de ratones transgénicos**

Para introducir la combinación humana P450/CPR en células HRN<sup>TM</sup>, puede usarse un vector adenoviral. Como alternativa, puede producirse la línea germinal en animales transgénicos que incorpore los mismos transgenes. Esto se consigue generando en primer lugar ratones transgénicos que incorporen los transgenes de humanización CYP3A4/CPR seleccionados y después cruzar estos con ratones HRN<sup>TM</sup> para producir animales CYP3A4-humanizados. La producción de ratones transgénicos CYP3A4/CPR se consigue usando la transfección dirigida de células madre embrionarias y posterior inyección en blastocistos. El cruzamiento de CYP3A4/CPR transgénicos con HRN<sup>TM</sup> para producir animales P450 humanizados puede usarse para la producción de ratones multi-P450 humanizados. Como alternativa, pueden producirse células madre embrionarias en las que el gen CPR está flanqueado por sitios *loxP* y en las que se han introducido secuencias de expresión para el P450 (o los P450) humano diana y CPR o para la proteína (o proteínas) de fusión P450-CPR humana. Los animales derivados de dichas células madre embrionarias pueden después cruzarse con diversas cepas de animales en las que se exprese la cre recombinasa bajo el control de diferentes promotores para producir la descendencia de P450 humanizados en diferentes tejidos o en condiciones de inducción diferentes, dependiendo de la especificidad tisular o de la inducibilidad del promotor que controla la expresión de la cre recombinasa.  
25  
30  
35

#### **Estrategias de Humanización**

Para establecer el procedimiento de expresión óptimo de las actividades del P450 humano funcional en células HRN<sup>TM</sup>, se compararon y evaluaron transgenes experimentales que codificaban proteínas de fusión citosólicas, proteínas de fusión diana, CPR diana con los P450 citosólicos por separado. En cada caso, la capacidad de P450 para interactuar con el componente CPR se determinó expresando estas alternativas en sistemas de cultivo de células apropiados y después se sometió a ensayo *in vivo* por transfección con adenovirus de ratones HRN<sup>TM</sup>.  
40

### **Ejemplo 3: Proyectos de Humanización**

#### 45 **Tipo 1: Expresión del ADNc humano a partir del promotor de ratón correspondiente.**

**Proyectos:** humanización de MDR1

**Procedimientos:** Los vectores diana se construyeron con procedimientos de clonación molecular convencionales. Estos vectores se diseñaron de tal manera, que el ADNc de la MDR1 humana se fusionó con el sitio de inicio de la traducción de los genes de ratón correspondientes (*Mdr1a* y *Mdr1b*). El *Mdr1* es un vector diana que lleva un casete de resistencia a higromicina flanqueado por FRT, el *Mdr1b* es un vector diana que lleva un casete de resistencia a neomicina flanqueado por F3. En ambos casos, los transcritos terminan en un motivo poliA. En el caso de *Mdr1a* el evento diana suprime la parte 3' del exón2, en caso del *Mdr1b* se suprime la parte 3' del exón2 al exón4. Véanse las Figuras 4 y 5.  
50

En dos rondas consecutivas de electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N los dos genes de ratón se modifican debido a recombinación homóloga. Los clones de cada ronda de transfección se seleccionan con  
55

G418 e hidromicina, respectivamente, y los clones positivos se identifican por análisis de transferencia de Southern. Los clones seleccionados se amplían, se inyectan en blastocistos de tipo *BALBc* y se transfieren a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determina por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usan para reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N. Los marcadores de selección se eliminan *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.

**Tipo 2: Expresión de una fusión de gen de ratón y ADNc humano a partir del promotor de ratón correspondiente**

**Proyecto:** Humanización de MRP2.

**Procedimientos:** El vector diana se construyó con procedimientos de clonación moleculares convencionales. El vector se diseñó de tal manera que, la "secuencia líder" de la proteína de ratón, codificada por el exón1, se conservará. El ADNc humano sin secuencias desde el exón1 se introduce en el exón2. Los sitios de corte y empalme originales para el intrón1 de ratón se conservarán, de tal manera que esta construcción codifica posiblemente una proteína de fusión de aminoácidos desde el exón1 de ratón y el exón2-32 de ser humano. El transcrito termina en un motivo poliA. El vector diana lleva un casete de resistencia a neomicina flanqueado por FRT (véase la Figura 6).

El vector diana se transfecta por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N. Los clones se seleccionan con G418 y los clones positivos se identifican por análisis de transferencia de Southern. Los clones seleccionados se amplían, se inyectan en blastocistos de tipo *BALBc* y se transfieren a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determina por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usan para una reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N. Los marcadores de selección se eliminan *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.

**Tipo 3: Expresión de un híbrido de ADNc humano y secuencias genómicas a partir del promotor de ratón correspondiente.**

**Proyecto:** Humanización de PXR

**Procedimientos:** El vector diana se construyó con procedimientos de clonación molecular convencionales. El vector se diseñó de tal manera que un híbrido de ADNc de PXR humano y secuencias genómicas se fusionan con el sitio de inicio de la traducción del gen PXR de ratón, por lo que el codon ATG de inicio de ratón se conserva. La secuencia PXR humana contiene el ADNc del exón1-4, secuencias genómicas del intrón4, exón5 y intrón5 y ADNc del exón6-9. El transcrito termina en un motivo poliA. El vector diana lleva un casete de resistencia a higromicina flanqueado por FRT y un motivo poliA aceptor de corte y empalme en dirección 3' para el casete de selección. Adicionalmente, los sitios att se habían insertado en el intrón1 de ratón y en dirección 3' hacia el motivo poliA aceptor de corte y empalme, que permite la generación de un PXR inactivado eliminando las secuencias intermedias con la recombinasa Phi-C31 específica de sitio (véase Figura 7).

El vector diana se transfecta por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N. Los clones se seleccionan con higromicina y los clones positivos se identifican por análisis de transferencia de Southern. Los clones seleccionados se amplían, se inyectan en blastocitos de tipo *BALBc* y se transfieren a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determina por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usan para una reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N. Los marcadores de selección se eliminan *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.

Confirmación de que el gen PXR murino se ha cambiado del homólogo humano

Se generaron ratones humanizados para PXR usando la estrategia anterior y eran fenotípicamente normales tras inspección visual. Esto se tipificó usando PCR (véase Figura 15). Los ratones vivieron al menos 3 meses. Los ejemplos incluyen machos "30643": Fecha de nacimiento: 12.12.2004. Vivieron hasta el 19.04.05. Hembras "30792": Fecha de nacimiento: 19.12.04. Vivieron hasta el 19.04.05. Estos ratones se reprodujeron con éxito:

30643 x 30792 establecido hasta el 01.02.2004

Camada nacida el 22.02.2005 - 6 crías - destetadas el 30.03.2005

50 Camada nacida el 06.04.2005 - 7 crías – a destetar.

Se realizó una tipificación posterior usando análisis Taqman<sup>®</sup> (véase la Figura 16). Este análisis demuestra claramente la presencia de un transcrito de PXR murino solo en los animales de tipo silvestre y la presencia del transcrito humano solo en las líneas de ratón transgénicas demuestran que se ha producido el cambio de gen y que la construcción génica se transcribió activamente en los tejidos correctos.

Después se realizó RT-PCR para confirmar la presencia de un transcrito PXR humanos de longitud completa en los ratones humanizados (véase la Figura 17). Este análisis demuestra la presencia de dos transcritos de tamaño 1,3 y 1,1 kilo-bases, lo que indica que todo el gen PXR humanizado se había transcrito. El tamaño de los fragmentos obtenidos indicó que las variantes de corte y empalme alternativas estaban presentes y que eran correctas.

- 5 El análisis de secuencia del transcrito de longitud completa confirmó que se había producido una fase de lectura abierta para todo el ARNm de PXR. La presencia de PXR se confirmó posteriormente por análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo suscitado contra el PXR murino.

Demostración de que el PXR humano era funcional

- 10 Para demostrar que la proteína PXR humana era funcional, se expusieron ratones a compuestos de activación de PXR incluyendo pregnenolona-16 $\alpha$  carbonitrilo (PCN) y rifampicina (Rif).

El día de la administración se prepararon soluciones de dosificación añadiendo aceite de maíz a la cantidad necesaria de sustancia de ensayo y agitando para obtener una solución o una suspensión fina. La concentración de PCN fue de 10 mg/ml y la de Rif fue de 2,5 mg/ml de producto químico proporcionado, sin ninguna corrección para la pureza. Se conservaron los registros de la preparación.

- 15 A los animales de control se les administró vehículo (aceite de maíz) diariamente por inyección intraperitoneal. El volumen del vehículo y de las soluciones de los agentes de inducción administrados fue de 10 ml/kg por peso corporal. Esta vía de administración se seleccionó por ser coherente con los trabajos publicados anteriormente.

Los animales recibieron 4 dosis diarias y se sacrificaron aproximadamente 24 horas después de la última dosis.

- 20 La cuantificación de las proteínas Cyp3a11, Cyp2b10 y PXR en los microsomas hepáticos de todas las muestras de los ratones se realizó mediante SDS-PAGE y transferencia de Western. Para detectar la proteína PXR humana y murina, se empleó un anticuerpo (RF8). Para la identificación de Cyp3a y Cyp2b, se usaron los anticuerpos anti-cyp2b (CH32 y CH4, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 18.

- 25 Estos datos demuestran una proteína de peso molecular correcto identificada tanto en los ratones de tipo silvestre como en los ratones PXR humanizados. Se observó que los pesos moleculares de las proteínas eran los idénticos lo cual era coherente con el peso molecular calculado para la secuencia de aminoácidos predicha. Además, fue interesante observar que el nivel de expresión de PXR entre los animales murinos y humanizados era muy similar, coherente con el hecho de que la expresión la realizaba el mismo promotor.

- 30 Los análisis para las proteínas inducibles por PXR en la familia de genes Cyp3a del citocromo P450 demostraron una notable inducción en el ratón PXR humanizado (véase la Figura 19). De manera interesante, el Cyp2b10 del citocromo P450 no se indujo notablemente mediante este tratamiento, demostrando que la inducción se realizaba mediante la proteína PXR y no mediante el factor de transcripción alternativo, el receptor constitutivo de androstano (CAR). En este experimento, Cyp3a11 también se indujo por rifampicina en animales de tipo silvestre. Aunque se indica que la rifampicina presenta diferentes especies en su capacidad para interactuar con PXR, el hecho de que no se observasen diferencias podría explicarse por la alta dosis del compuesto usado.

- 35 Ensayos de actividad enzimática

- 40 Usando ensayos de actividad enzimática sobre microsomas hepáticos, los autores de la presente invención pudieron confirmar los resultados por transferencia de Western. La actividad de la pentoxiresorufin-O-desetilación (PROD) se atribuyó al nivel de expresión de Cyp 2b10 y la actividad de la 7-benziloxiquinolina (BQ) se atribuyó al nivel de expresión del Cyp 3a. Los datos de actividad enzimática para inducción de Cyp3a y Cyp2b por rifampicina se muestran en la Figura 20.

Estudio de inducción en ratones huPXR usando dosis bajas de rifampicina y TCPOBOP

- 45 Para demostrar diferencias de cepas entre el ratón de tipo silvestre y el huPXR, los ratones se expusieron a dosis bajas de rifampicina o TCPOBOP. Estos compuestos se seleccionaron porque se había indicado que la rifampicina era un inductor más eficaz sobre el PXR humano que el factor de transcripción murino y se había indicado que TCPOBOP era un inductor más eficaz de la expresión del gen del citocromo P450 en el sistema de ratón que en el humano.

El estudio consistió en 3 animales por grupo. Los grupos de control consistían en ratones tratados con aceite de maíz diariamente durante 4 días o ratones a los que se administraba una sola inyección de aceite de maíz. Los ratones tratados se dosificaron con agentes de inducción como se detalla en la Tabla 3.1.

- 50

Tabla 3.1: - Diseño experimental para el estudio de inducción en ratones huPXR usando dosis bajas de rifampicina y TCPOBOP

Cepa de ratón	Agente inductor	Dosis (mg/kg)	Vehículo	Régimen
C57BL/6J	Control I	-	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
huPXR	Control I	-	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
C57BL/6J	RIF	3	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
C57BL/6J	RIF	10	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
huPXR	RIF	3	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
huPXR	RIF	10	Aceite de maíz	4 inyecciones diarias ip
C57BL/6J	Control II	-	Aceite de maíz	1 sola inyección ip
huPXR	Control II	-	Aceite de maíz	1 sola inyección ip
C57BL/6J	TCPOBOP	0.3	Aceite de maíz	1 sola inyección ip
C57BL/6J	TCPOBOP	1	Aceite de maíz	1 sola inyección ip
huPXR	TCPOBOP	0.3	Aceite de maíz	1 sola inyección ip
huPXR	TCPOBOP	1	Aceite de maíz	1 sola inyección ip

La actividad de PXR se determinó midiendo el metabolismo de diversos sustratos del citocromo P450 que se metabolizan a diferentes grados por diferentes enzimas del citocromo P450. Se realizaron los siguientes ensayos:

- 5
- La actividad de la 7-benziloxiquinolona (BQ) se determinó en microsomas hepáticos.
  - La actividad hidrolasa en la testosterona se determinó en microsomas hepáticos (LMS HPLC-006).
  - Las actividades específicas de estas reacciones se expresaron por mg de proteína determinado usando el ensayo Lowry (LMS Spec-0001).

10 En el primer experimento, como sustrato se tomó la 7-benziloxiquinolona. En los animales tratados con rifampicina, en el primer caso, hubo claramente una diferencia entre la actividad enzimática de fondo de CYP3A entre los ratones de tipo silvestre y PXR humanizados (Figura 21). Además, aunque esta actividad enzimática no fue inducible por rifampicina, hubo una notable diferencia en cuanto a la actividad enzimática entre los animales de tipo silvestre y PXR humanizados a una dosis de 3 mg/kg.

15 En experimentos posteriores, se midió la hidroxilación de LA testosterona en fracciones microsomales hepáticas de ratones de tipo silvestre y huPXR. Fue interesante observar que a una dosis de 10 mg/kg no hubo inducción de 6-beta hidroxilación de la testosterona en los animales de tipo silvestre mientras que hubo una inducción significativa de en los animales PXR humanos, demostrando una sensibilidad modificada de estos ratones a rifampicina con respecto a los de tipo silvestre (Figura 22).

20 Hubo un hallazgo similar para la medición de la 16-beta hidroxilación de la testosterona que, de modo similar a la desmetilación de la 7-benziloxiquinolona, mostró mayor actividad en los controles (Figura 23). De nuevo, esta actividad se indujo en los animales huPXR pero no en los de tipo silvestre. De hecho, la actividad fue aproximadamente de 3 veces en los ratones huPXR.

Hubo un hallazgo similar en la 2-alfa hidroxilación de la testosterona. Además, la inducción de Cyp3a11 por rifampicina demuestra que el huPXR es funcionalmente activo en ratones huPXR.

25 En experimentos que usaban el agente inductor TCPOBOP, también se midió el metabolismo hepático microsomal de la testosterona. De nuevo se observaron claras diferencias entre los animales de tipo silvestre y huPXR. En particular, la 7-alfa hidroxilación de la testosterona fue constitutivamente más alta en los animales huPXR con respecto a los de tipo silvestre (Figura 24).

30 La 6-beta hidroxilación de la testosterona fue inducible en ambas cepas de ratón. Aunque no hubo diferencias significativas entre los ratones de tipo silvestre y huPXR, esto demuestra de nuevo que el PXR humano es activo (Figura 25).

35 Coherente con las diferencias de cepas en tipo silvestre y PXR humano, hubo notables diferencias en la sensibilidad de las líneas de ratón a la inducción por TCPOBOP. En el caso de la 16-alfa hidroxilación de la testosterona esta, actividad se indujo significativamente en los animales de tipo silvestre pero no en los animales huPXR, y de particular interés fue la observación de que la inducción de la 16-beta hidroxilación de testosterona fue mucho más notable en los animales de tipo silvestre que en los huPXR (véanse Figuras 26 y 27 respectivamente). De hecho, a una dosis de 1 mg/kg, la inducción de la 16-beta hidroxilación de la testosterona fue de aproximadamente 6 veces en los animales de tipo silvestre pero solo de 1,7 veces en los animales huPXR. Esto de nuevo demuestra una sensibilidad reducida de los ratones humanizados con respecto a los controles.



Este es el primer informe de un modelo de ratón en el que el gen PXR humano se ha cambiado por la proteína murina endógena. Las ventajas de un modelo de este tipo con respecto a otros ratones PXR humanizados se basan en el hecho de que:

- 5 • La construcción usada permite abordar estudios para entender la función del corte y empalme alternativo de PXR controlando su nivel de expresión.
- El uso del promotor de ratón endógeno PXR se expresa en todos los tejidos de una manera similar a la de los genes endógenos.
- El nivel de expresión de PXR parece ser muy similar al del gen endógeno, por lo tanto se reducen problemas con posible sobre/infra expresión.
- 10 • Los modelos de PXR humanizados actualmente disponibles usan el promotor de albúmina para conducir el PXR humano que se ha cruzado en un fondo nulo de PXR. Por lo tanto, PXR se expresa a niveles muy altos en este modelo y no hay PXR en ningún tejido distinto al hígado. Esto compromete gravemente el uso de este modelo para entender la función de hPXR controlando la expresión génica en el tracto GI o en la barrera hematoencefálica o, de hecho, en cualquier otro tejido.
- 15 Los ratones PXR humanizados tienen diversas utilidades. Por ejemplo, estos ratones pueden usarse para entender la función del PXR humano en el control de la expresión génica en cualquier tejido en el ratón. También pueden usarse para evaluar si los fármacos en desarrollo o los productos químicos ambientales tienen la capacidad de modular las funciones del PXR humano de una manera que sean beneficiosos o perjudiciales. El modelo también permite estudios para entender la función del PXR humano en la mediación de posibles efectos tóxicos de fármacos o productos químicos que pueden resultar de perturbaciones, por ejemplo, en la homeostasis de ácidos biliares y por lo tanto su importancia en el hombre. El modelo también puede usarse para evaluar productos químicos que puedan ser agonistas o antagonistas para esta ruta de señalización.
- 20

Tipo 4: Expresión de una secuencia genómica humana a partir del promotor de ratón correspondiente.

Proyecto: Humanización de CAR

- 25 Procedimientos: El vector diana se construyó con procedimientos de clonación molecular convencionales. El vector se diseñó de tal manera que la secuencia CAR humana genómica se fusionó con el sitio de inicio de la traducción del gen CAR de ratón. La secuencia CAR humana contiene todas las secuencias genómicas de los exones 1-9, excepto las UTR 5' y 3', que se conservan del genoma de ratón. El resto de partes de las secuencias codificantes del gen CAR de ratón se suprimirán. El transcrito termina en un motivo poliA. El vector diana llevaba un casete de resistencia a neomicina flanqueado por FRT. Adicionalmente, todos los sitios att se habían insertado en el intrón 2
- 30 humano y en dirección 3' con respecto al marcador de selección, lo que permite la generación de un CAR inactivado por eliminación de secuencias intermedias con la recombinasa Phi-C31 específica de sitio (véase la Figura 8).

- 35 El vector diana se transfectó por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N PXR humanizadas. Los clones se seleccionan con higromicina y los clones positivos se identifican por análisis de transferencia de Southern. Los clones seleccionados se ampliaron, se inyectaron en blastocistos de tipo BALBc y se transfirieron a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determinó por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usaron para reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N. Los marcadores de selección se eliminaron *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.

- 40 El vector diana se transfectó por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N. Los clones se seleccionan con higromicina y los clones positivos se identificaron por análisis de transferencia Southern. Los clones seleccionados se ampliaron, se inyectaron en blastocistos de tipo BALBc y se transfirieron a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determinó por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usaron para reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N. Los marcadores de selección se eliminaron *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.
- 45

Confirmación por PCR en dos ratones homocigotos PXR/CAR doble humanizados de que el gen PXR murino se había cambiado por el homólogo humano.

- 50 Se generaron ratones humanizados para PXR y CAR usando ratones que contenían el PXR humanizado y cruzando estos con ratones que contenían el CAR humanizado para producir ratones que contenían tanto el PXR humanizado como el CAR humanizado. Los ratones eran fenotípicamente normales después de inspección visual. Se habían tipificado usando PCR (véase Figura 28) y se humanizaron homocigóticamente para PXR y CAR. Los ejemplos incluyen ratones denominados "42749" y "42752".

Ensayo de sueño con Pentobarbitona

En este experimento, se determinó la actividad de estos factores de transcripción en combinación midiendo el tiempo de sueño inducido por barbitúricos. Desde hace muchos años se sabía que el tiempo de sueño es directamente proporcional a la actividad hepática del citocromo P450 y esta actividad puede atribuirse, al menos en parte, a los niveles de P450 en el hígado determinados por la función de CAR y PXR.

A los ratones se les administró una sola dosis intraperitoneal de Narcoren (pentobarbitona sódica; adquirida en consulta de veterinario; distribuida por Merial GmbH, Alemania) a 25 mg/kg de peso corporal. Se midió el tiempo en que los ratones tardaban en perder y recuperar posteriormente su reflejo correcto. Los resultados se proporcionan en la siguiente Tabla 4.1:

10 *Tabla 4.1; resultados del ensayo de sueño con pentobarbitona*

Genotipo	Sexo	Edad (semanas)	ID	Peso (g)	Tiempo de sueño (min)
Tipo silvestre	macho	10	42912	21,2	21
PXR/CAR hum	macho	10	42749	24,8	34

Mientras que los ratones de tipo silvestre, a los que se les había proporcionado la dosis de narcótico de pentobarbitona, durmieron durante 21 minutos, los ratones doble humanizados para CAR y PXR durmieron durante 34 minutos. Por lo tanto estos ratones demuestran una diferencia significativa con respecto a sus controles de tipo silvestre lo que indica que el ratón doble humanizado tiene una marcada diferencia en cuanto a su respuesta a fármacos con respecto a los animales de tipo silvestre.

**Resumen de los trabajos de los Tipos 3 y 4 anteriores**

Se desarrolló un modelo en el que el PXR humano se expresaba tanto en el hígado como el tracto GI de ratones de la manera predicha a niveles equivalentes a los de los genes endógenos. La proteína PXR había demostrado ser funcional dado que los ratones eran sensibles a compuestos que se sabía que inducían la expresión de genes mediante esta ruta. Se demostró una diferencia de cepas entre los ratones de tipo silvestre y humanizado y se observó que los ratones humanizados eran más sensibles a un compuesto que se sabía que era más activo para hPXR. Además de los experimentos de animales realizados con los ratones PXR humanizados, los ratones que contenían el PXR humanizado también se habían cruzado con ratones que contenían CAR humanizado para producir ratones que contenían tanto CAR como PXR humanizados.

**Tipo 5: Expresión de un híbrido de ADNc humano y secuencias genómicas a partir del promotor humano correspondiente por inserción en el locus ROSA26.**

**Proyectos:** Humanización de CYP3A4 y CYP2C9

**Procedimientos:** Los vectores diana se construyeron con procedimientos de clonación molecular convencionales. El vector diana básico ROSA26 se diseñó de manera que el gen de neomicina se expresará a partir del promotor ROSA26 endógeno en clones ES correctamente dirigidos. El transcrito Neo termina en un motivo poliA.

En el caso de CYP3A4, el casete de humanización, en dirección 3' con respecto al marcador de selección, contiene el promotor CYP3A4 humano de 13 kb, el exón 1 y el intrón 1 como en la constitución genómica normal y un ADNc humano que consiste en los exones 2-13. Los transcritos terminan en un motivo poliA (véase la Figura 9).

En el caso de CYP2C9, el casete de humanización, en dirección 3' con respecto al marcador de selección, contiene el promotor CYP2C9 humano de 12 kb, un ADNc humano de 1-4 exones, intrón 4 y un ADNc de exones 5-9. El transcrito termina en un motivo poliA (véase la Figura 10).

El vector diana se transfectó por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N. Los clones se seleccionaron con G418 y los clones positivos se identificaron por análisis de transferencia Southern. Los clones seleccionados se ampliaron, se inyectaron en blastocistos de tipo BALBc y se transfirieron a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determinó por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usaron para reproducción posterior en un fondo genético C57BL/6N.

**Tipo 6: Reemplazo de regiones genómicas grandes (Cambios de grupos)**

**Proyectos:** Cambio de grupo CYP3A, cambio de grupo CYP2C y humanización UGT.

**Procedimientos:** Los vectores diana se construyeron con procedimientos de clonación molecular convencionales. El principio general era que se construían dos tipos de vectores diana y se usaban para dos rondas de transfección consecutivas por electroporación convencional en células ES de ratón C57BL/6N. El primer vector contenía un casete TK funcional y un gen Neo suprimido en dirección 5' interrumpido desde su codon ATG de inicio de la

traducción y un promotor para un sitio loxP de tipo silvestre. El segundo vector llevaba casetes de TK funcional y de higromicina, un sitio loxP de tipo silvestre y un sitio lox511. Los vectores diana finales de cada uno de los cambios de grupos se diseñaron de tal manera que, en clones ES correctamente dirigidos, las secuencias genómicas intermedias con respecto a los sitios tipo silvestre-loxP pueden eliminarse por supresión mediada por Cre. Esto da como resultado una inactivación del grupo génico flanqueado por loxP.

5 Para introducir secuencias humanas por inserción mediada por Cre en células ES re-derivadas, se usarán cromosomas artificiales bacterianos (BAC) modificados. Los casetes de selección que flanquean los grupos humanizados pueden eliminarse por supresión mediada por FLP (véase Figura 11).

**Ejemplo 4: proyectos con indicadores**

10 **Proyectos:** Indicadores CYP3A4-, CYP2C9-, CYP2C19-, CYP2B6-, CYP2D6- y MDR1-

**Procedimientos:** Los vectores diana se construyeron con procedimientos de clonación molecular convencionales. Todos los BAC humanos indicadores se modificaron de tal manera que un gen indicador se fusionó con el sitio de inicio de la traducción del gen humano correspondiente. Los BAC modificados llevaban un casete Keo flanqueado por FRT, lo que permitía la selección de colonias bacterianas con kanamicina y la de los clones de células ES de ratón con G418. En el caso de CYP3A4, CYP2C9 y CYP2C19 el transcrito del gen indicador no terminaba en un motivo poliA, pero las construcciones se diseñaron de tal manera, que posiblemente se usó el motivo poliA endógeno. Estas construcciones dependen por lo tanto de un corte y empalme correcto de los exones en dirección 3' con respecto al indicador (véase la Figura 12).

15 En el caso de CYP2D6 y CYP2B6 el transcrito del gen indicador termina en un motivo poliA unido al gen indicador con un intrón sintético (véase la Figura 13).

20 En el caso de MDR1 el transcrito del gen indicador termina en un motivo poliA sin ningún intrón adicional (véase la Figura 14).

25 El BAC modificado se linealizó con NotI y se transfectó en células ES de ratón C57BL/6N por electroporación convencional o por lipofección con *Lipofectamin 2000*. Los clones se seleccionan con G418 y los clones positivos con ADN integrado al azar se identificaron por análisis PCR. Los clones seleccionados se ampliaron, se inyectaron en blastocistos de tipo *BALBc* y se transfirieron a madres adoptivas de acuerdo con procedimientos operativos convencionales. Las camadas de estos adoptados se inspeccionan visualmente y el quimerismo se determinó por el color del pelo. Los animales muy quiméricos se usaron para reproducción posterior en un fondo genético C57BL/ 6N. Los marcadores de selección se eliminaron *in vivo* cruzando con una cepa supresora FLP.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, que incorporan en su genoma al menos una secuencia de ADN humano que codifica al menos un factor de transcripción que está bajo el control de un promotor del factor de transcripción y cuyos genes endógenos equivalentes se han anulado, incorporando adicionalmente el ratón, los tejidos o las células derivados del mismo, al menos una o más de las siguientes secuencias de ADN humano adicionales seleccionadas del grupo que comprende:
- 5 (i) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1;  
(ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o  
(iii) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos
- 10 y cuyo gen o genes equivalentes endógenos se han anulado;  
en el que la secuencia humana que codifica al menos un factor de transcripción se inserta en el punto del genoma en el que existe de modo natural el gen endógeno equivalente; y  
en el que el factor de transcripción se selecciona del grupo que comprende el receptor de pregnano X (PXR/SXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR) o una combinación de los mismos.
- 15 2. Un ratón transgénico, o tejido o células derivadas del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ADN humano que codifica un factor de transcripción comprende tanto el receptor de pregnano X (PXR) como el receptor constitutivo de androstano (CAR).
3. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 se selecciona del grupo que comprende los citocromos P450.
- 20 4. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el P450 comprende una cualquiera o más de las siguientes isoformas: CYP3A4, CYP2C9, CYP2C 19, CYP2D6, CYP1A2, CYP2C8 y CYP2B6.
5. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 comprende los grupos génicos CYP3A y/o CYP2C.
- 25 6. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 comprende una cualquiera o más de las transferasas seleccionadas del grupo que comprende una glucuronil transferasa, una glutatión transferasa, una sulfonil transferasa y una acetil transferasa.
- 30 7. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el ADN humano que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2 comprende el grupo génico UGT1A.
8. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos se selecciona del grupo que comprende una proteína de casete de unión a ATP, proteínas de resistencia a múltiples fármacos, proteínas asociadas a una resistencia a múltiples fármacos o polipéptidos de transporte de aniones orgánicos.
- 35 9. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el ADN humano que codifica una proteína transportadora de fármacos codifica las proteínas MDR1 o MRP2.
10. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las secuencias de ADN humano incluyen secuencias codificantes unidas operativamente a secuencias de ADN humano reguladoras.
- 40 11. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incorpora:
- 45 (i) una secuencia de ADN humano que codifica un factor de transcripción PXR y/o uno CAR  
(ii) una secuencia de ADN humano que codifica la enzima CYP3A4; y  
(iii) una secuencia de ADN humano que codifica la proteína MDR1.
12. Un ratón transgénico, o tejido o células derivados del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un promotor del factor de transcripción y/o una enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y/o de fase 2 y/o una proteína transportadora de fármacos está unido a un indicador que permite controlar la regulación relativa de al menos una enzima implicada en una disposición de fármaco/sustancia xenobiótica.
- 50 13. Un procedimiento de introducción de al menos un factor de transcripción humano funcional en una célula de ratón en la que su propio gen (genes) endógeno(s) equivalente(s), que expresa(n) la proteína citada anteriormente,

se ha(n) vuelto inactivo(s), incorporando adicionalmente la célula de ratón derivada del mismo al menos una o más de las siguientes secuencias de ADN humano adicionales seleccionadas del grupo que comprende:

- 5 (i) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 1;  
 (ii) una secuencia de ADN que codifica una enzima metabolizante de fármacos de fase 2; y/o  
 (iii) una secuencia de ADN que codifica una proteína transportadora de fármacos

10 y cuyos propios genes endógenos equivalentes que expresan las proteínas antes citadas se han vuelto inactivos; comprendiendo el procedimiento la introducción de los ADN que codifican dicho factor de transcripción humano, dicha enzima metabolizante de fármacos de fase 1 y 2 y/o dicha proteína transportadora de fármacos de tal manera que dichos productos de expresión humanos permanecen funcionales donde los propios genes endógenos de la célula de ratón se han vuelto inactivos y  
 15 en el que los genes de ratón cuyos productos proteicos son análogos a los productos proteicos de las secuencias de ADN humano introducidas se suprimen bien por direccionamiento directo con sus homólogos humanos o bien flanqueando estos genes o grupos génicos con sitios de reconocimiento y posterior supresión mediada por una recombinasa, de tal manera que la secuencia de ADN humano se inserta en el punto en el genoma en el que existe de modo el gen endógeno equivalente; y en el que la célula se humaniza para los PXR y CAR individualmente o en combinación.

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los genes humanos están al menos parcialmente conservados dentro de una construcción.

20 15. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que la construcción PXR conserva la estructura de intrón-exón entre los exones 4 y 6.

16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en el que la construcción CAR conserva la estructura de intrón-exón entre los exones 2 y 9.

17. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la célula de ratón se produce *de novo*.

25 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 en el que las secuencias de ADN se suprimen por direccionamiento directo con sus homólogos humanos o flanqueando estos genes o grupos génicos con sitios de reconocimiento y posterior supresión mediada por una recombinasa.

30 19. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 que comprende adicionalmente la etapa de introducción de una secuencia de ADN de un gen indicador de tal manera que los productos de expresión puedan medirse evaluando los productos de transcripción o de traducción.

35 20. Uso de un ratón transgénico, tejidos y/o células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para investigar el metabolismo o la toxicidad de una sustancia xenobiótica en dichos ratón transgénico, tejidos y/o células derivadas del mismo, o el metabolismo y/o la biosíntesis de compuestos endógenos; para investigar el funcionamiento y la regulación de mecanismos humanos del metabolismo, la disposición y la toxicidad de sustancias xenobióticas a estudiar en tracto gastrointestinal, barrera hematoencefálica, hígado, riñón en un solo animal, tejido o célula derivada del mismo; para investigar los efectos del metabolismo, la disposición o la toxicidad humana sobre los efectos antitumorales de un fármaco en un experimento de xenoinjerto en un ratón, expresando vías metabólicas humanizadas en una línea de células tumorales injertadas de ratón y/o en el animal hospedador murino.

**FIG. 1**  
 Humanización e inactivación de PXR y CAR

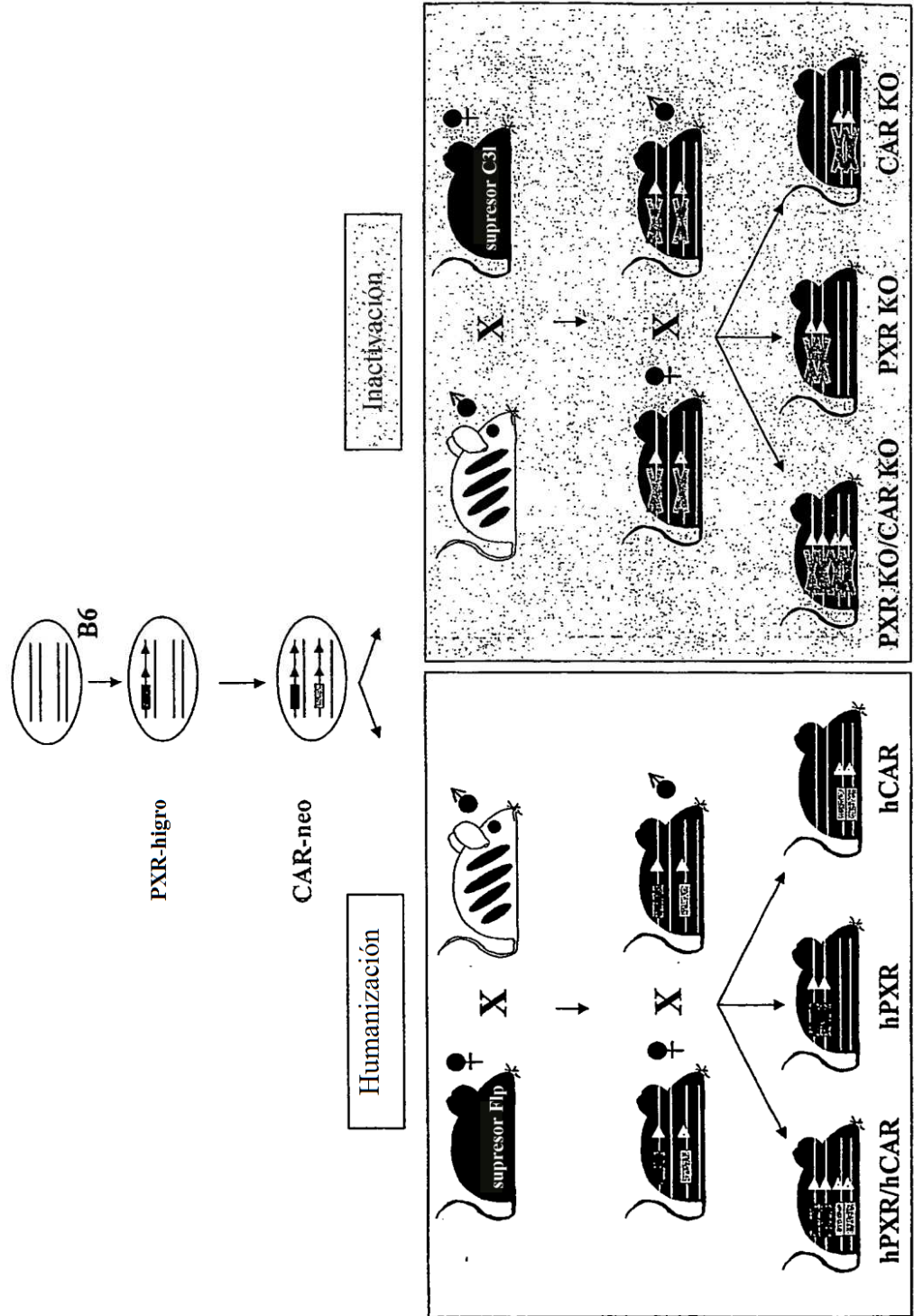
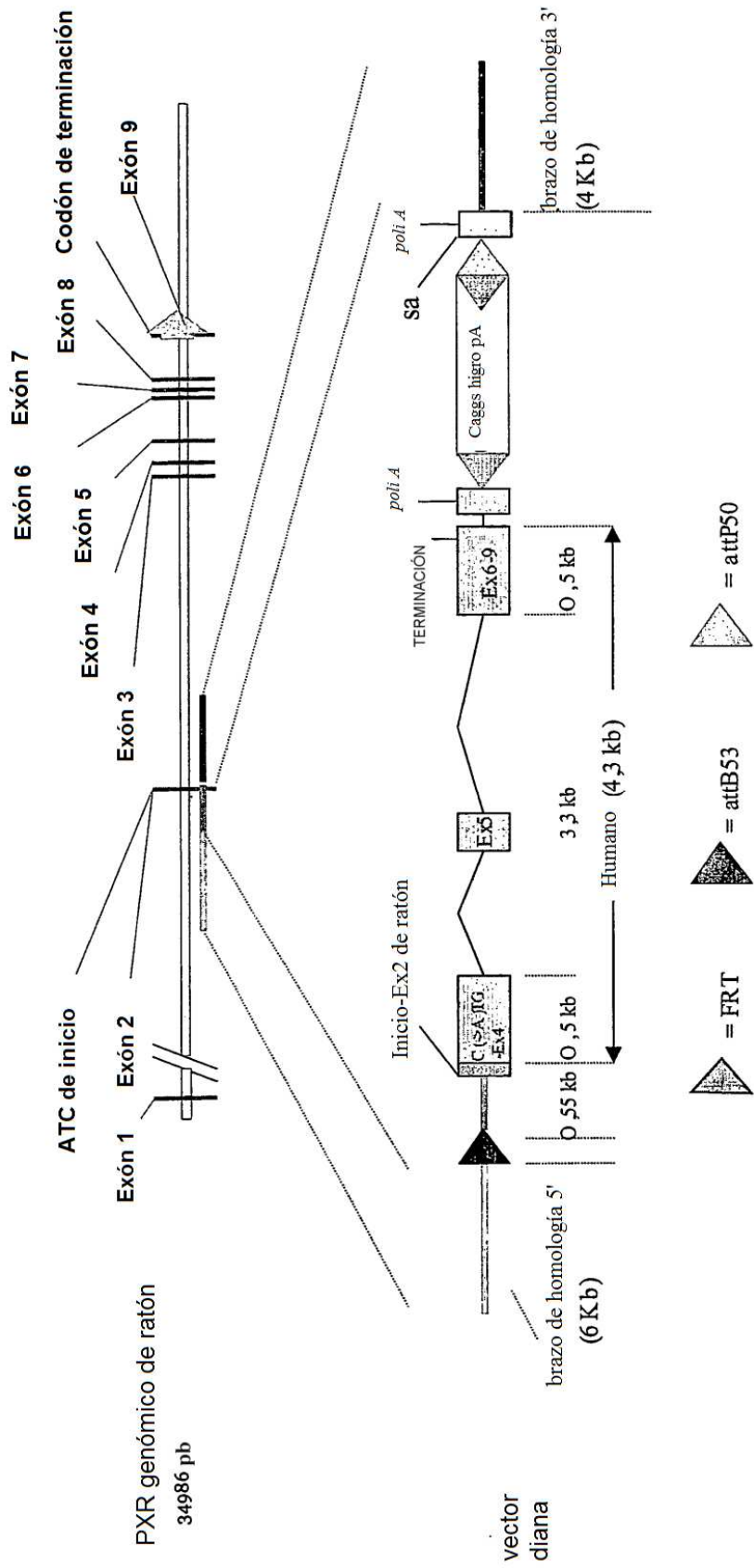
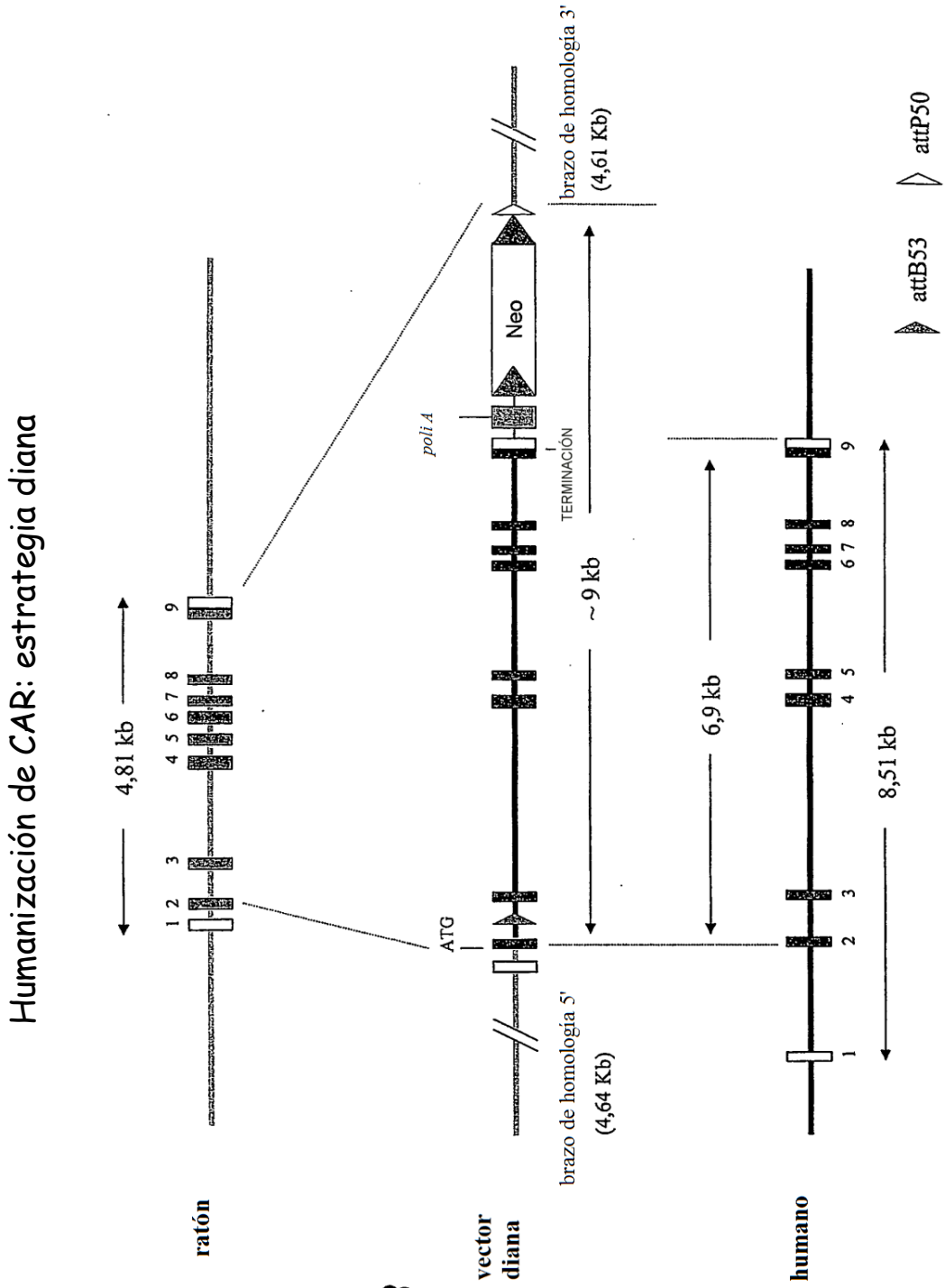


FIG. 2

Humanización de PXR: estrategia diana

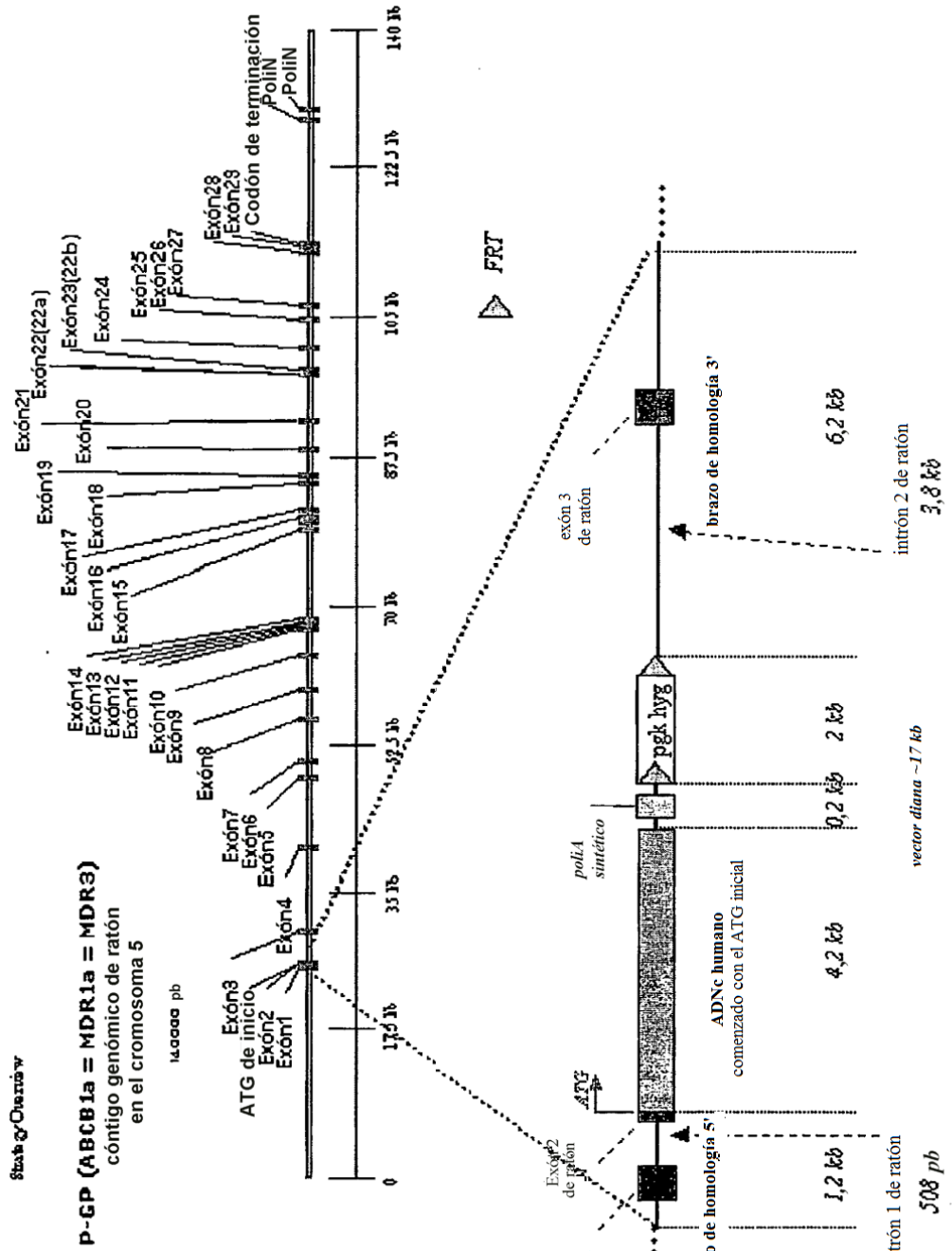




**FIG. 3**

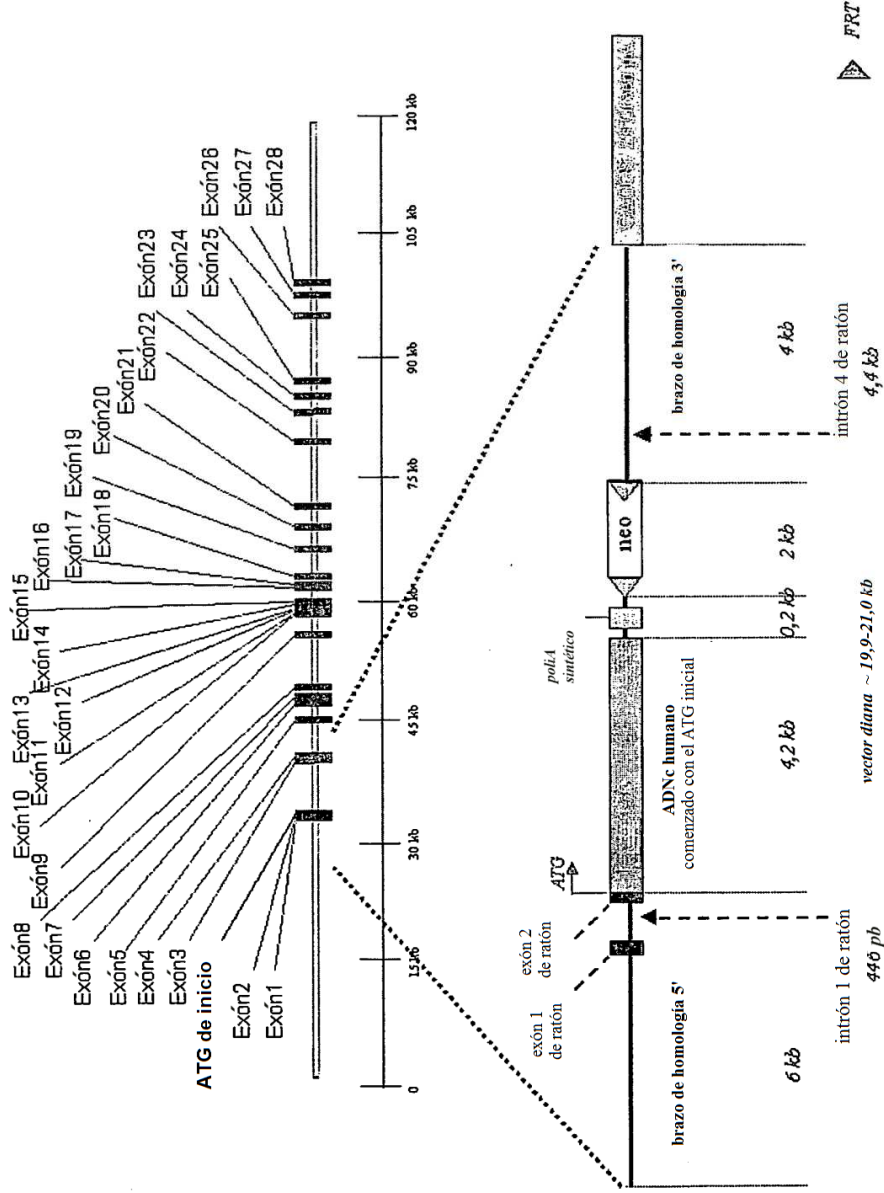


**FIG. 4 (Mdr1a)**

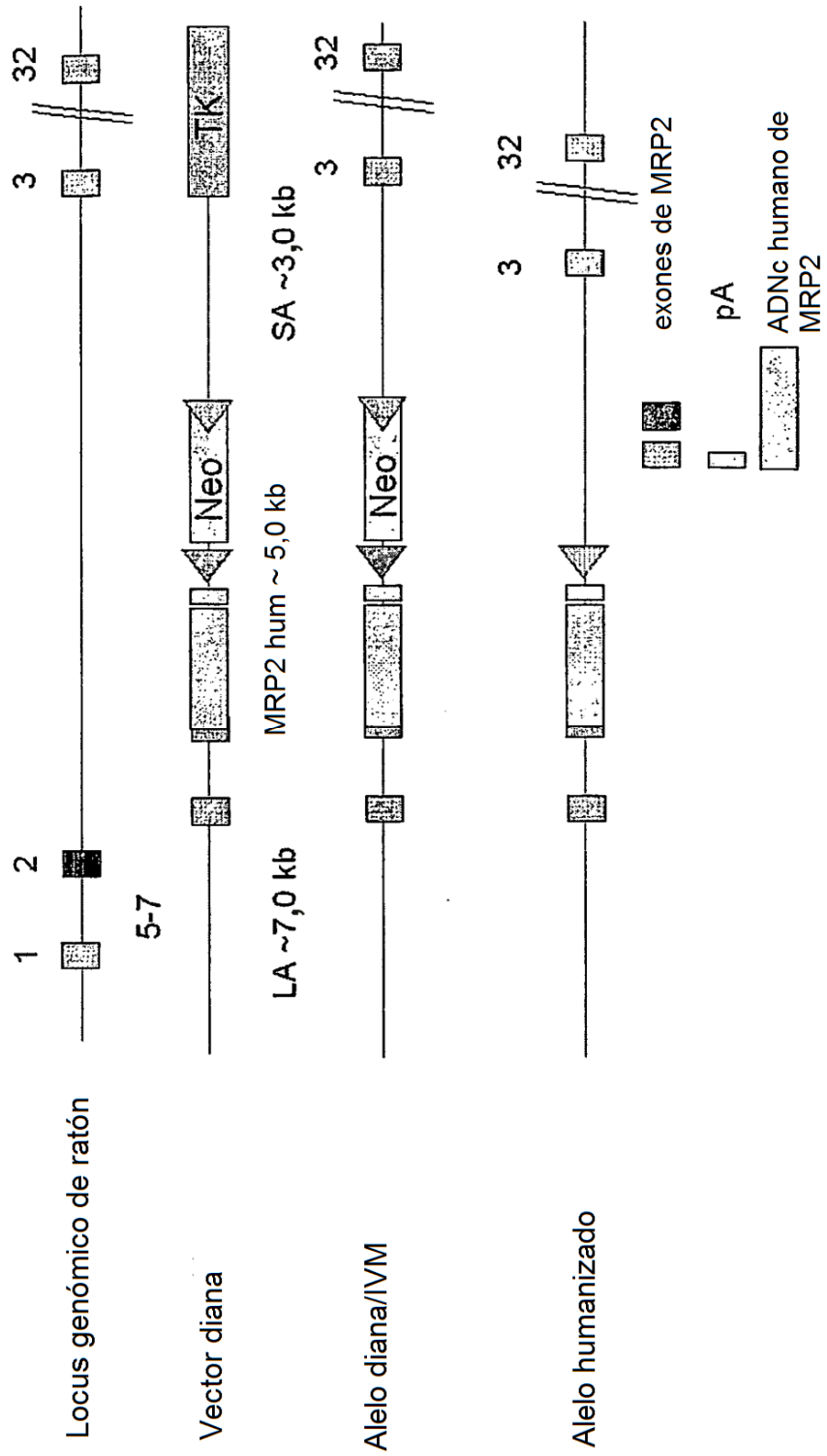


**FIG. 5 (Mdr1b)**

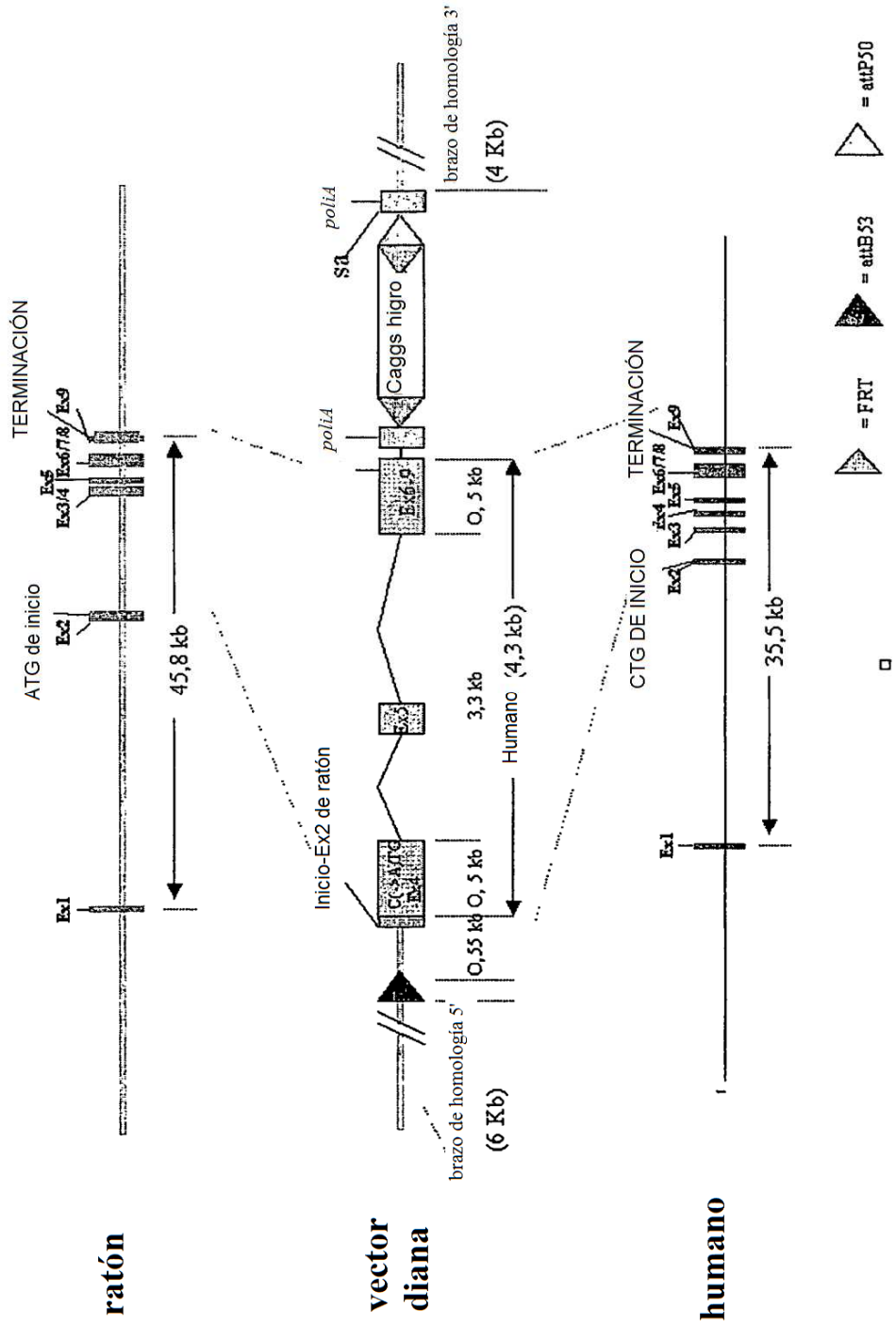
**P-GP (ABCB1b = MDR1b = MDR1) cóntigo genómico de ratón en el cromosoma 5**



**FIG. 6 (MRP2)**  
**Proyecto KI condicional de MRP2**

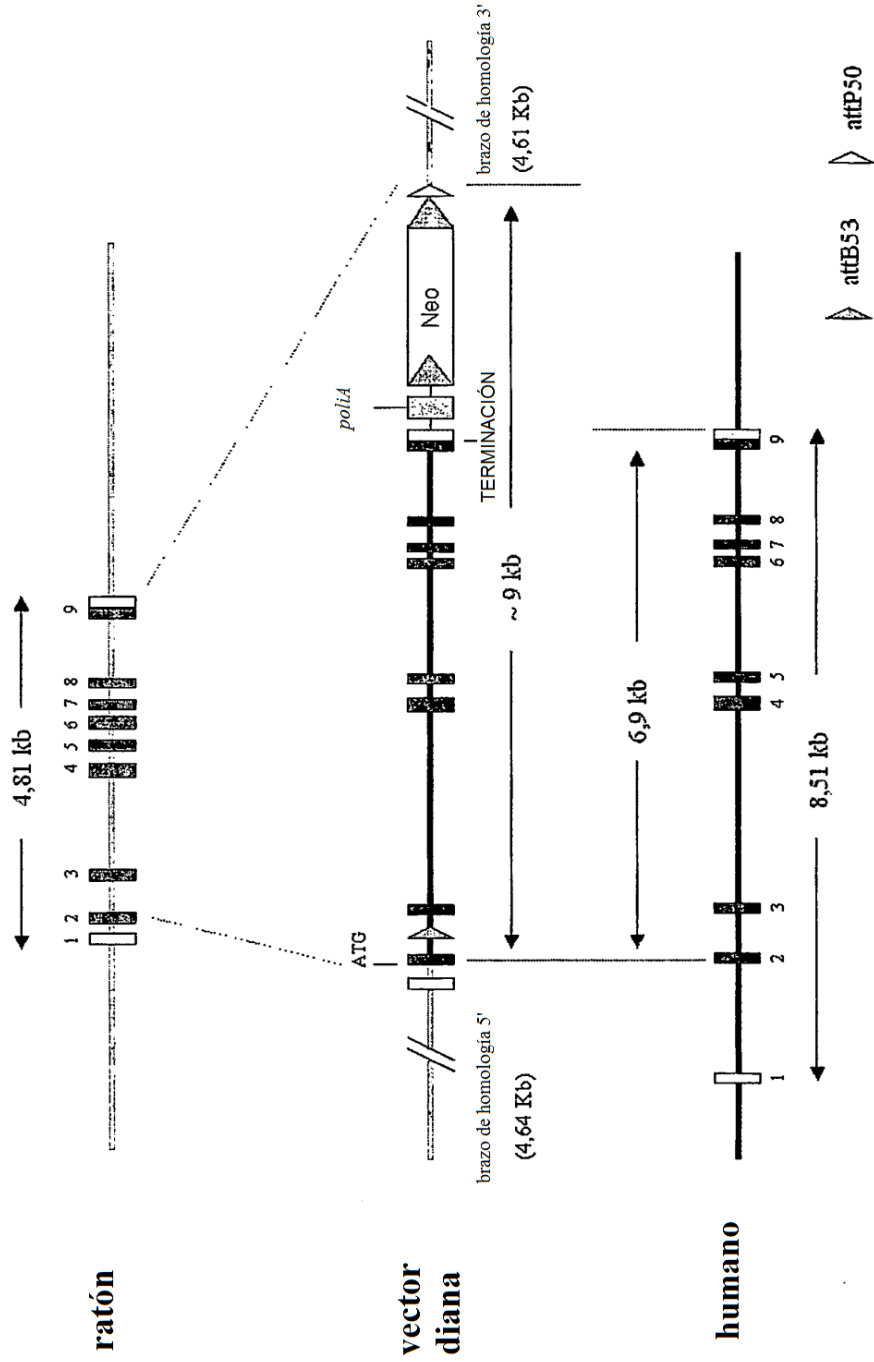


**FIG. 7 (PRX)**  
**Humanización de PXR: estrategia diana**



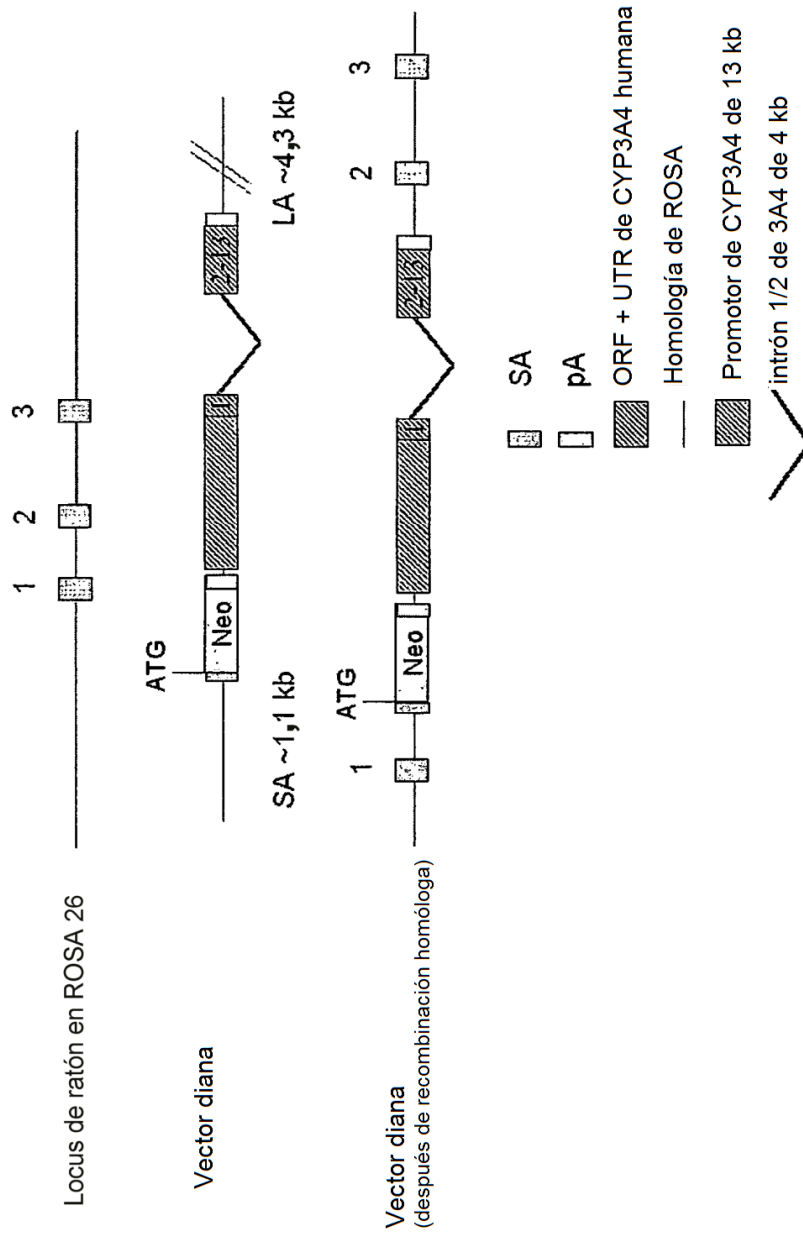
**FIG. 8 (CAR)**

Humanización de CAR: estrategia diana

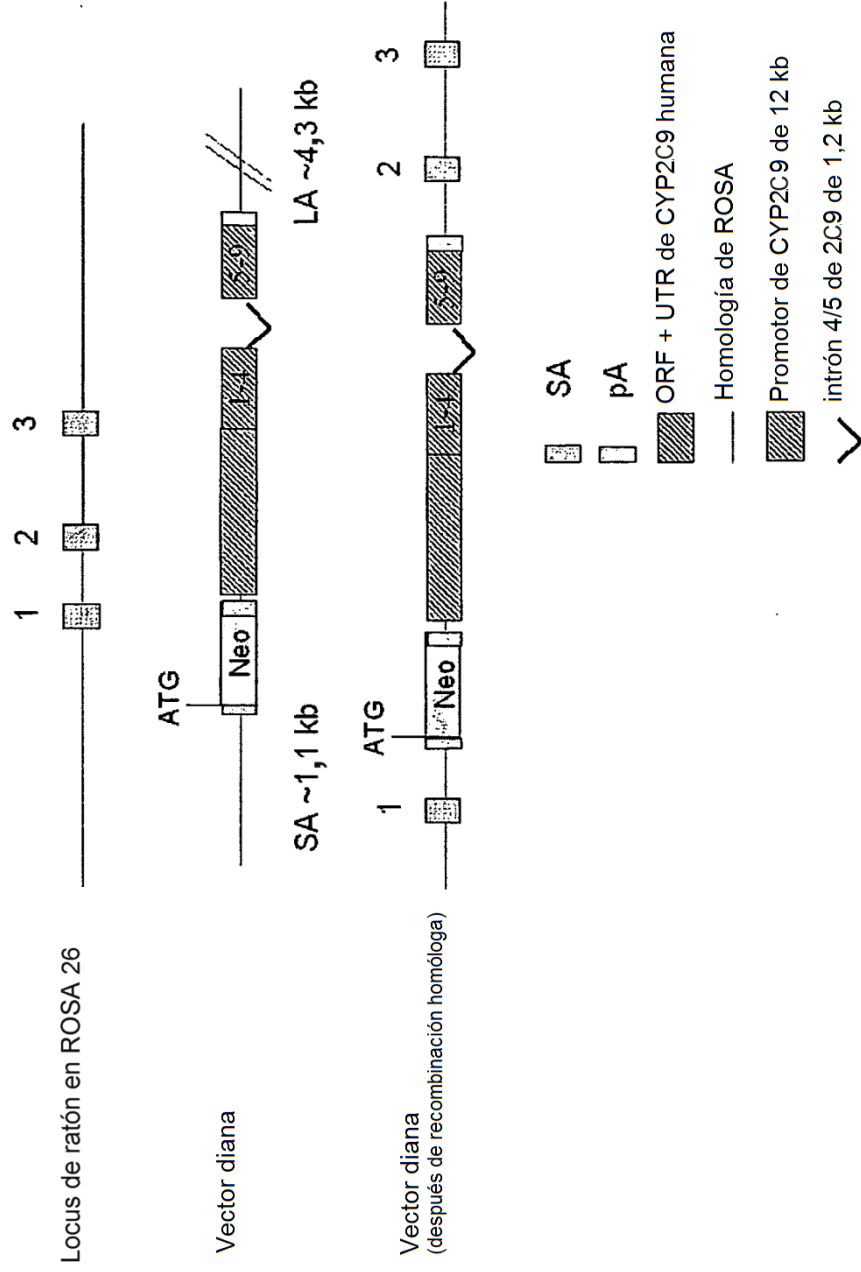


**FIG. 9 (CYP3A4)**

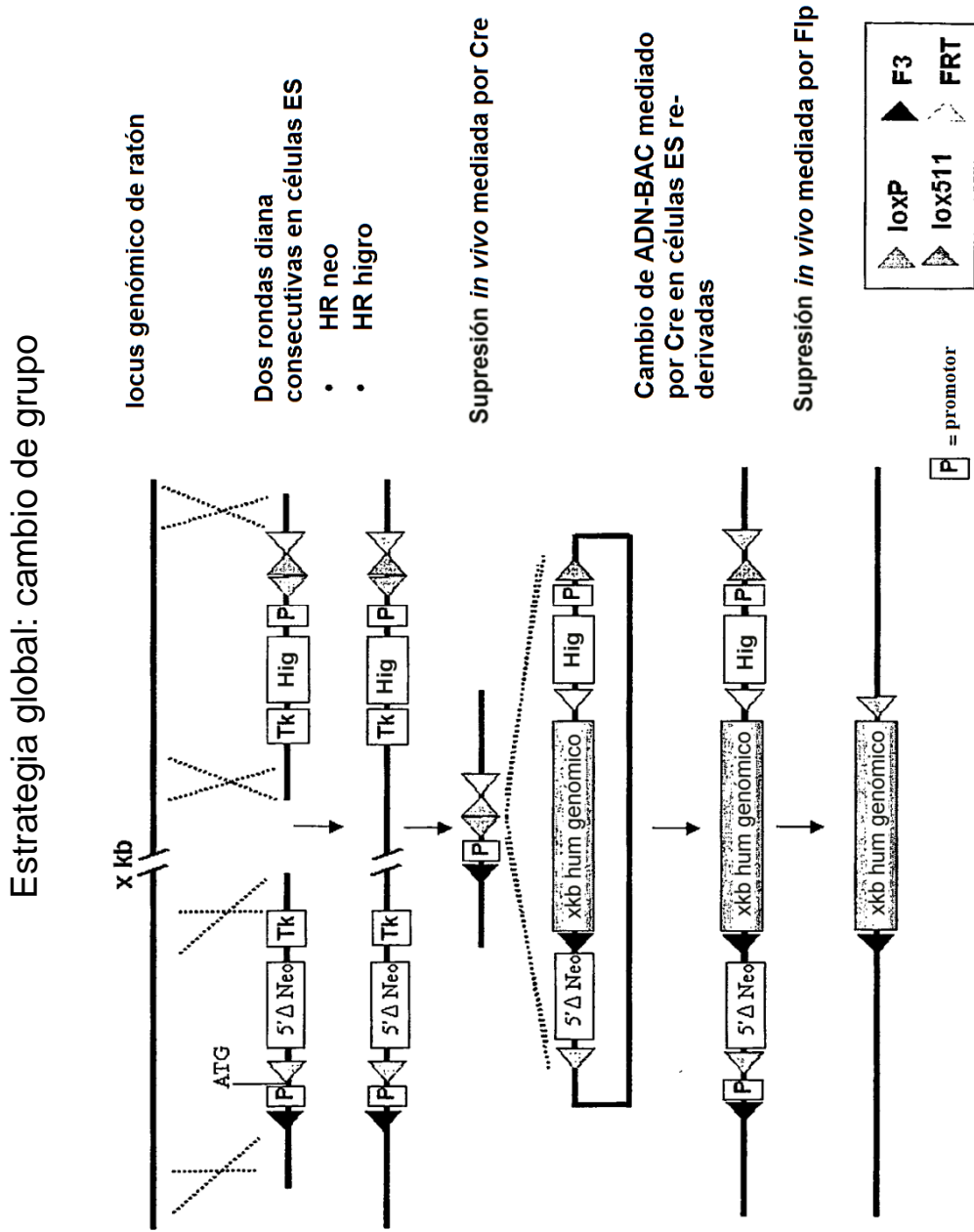
Expresión de tipo humana del ADNc de CYP3A4 por KI



**FIG. 10 (CYP2C9)**  
 Expresión de tipo humana del ADNc de CYP2C9 por ROSA 26

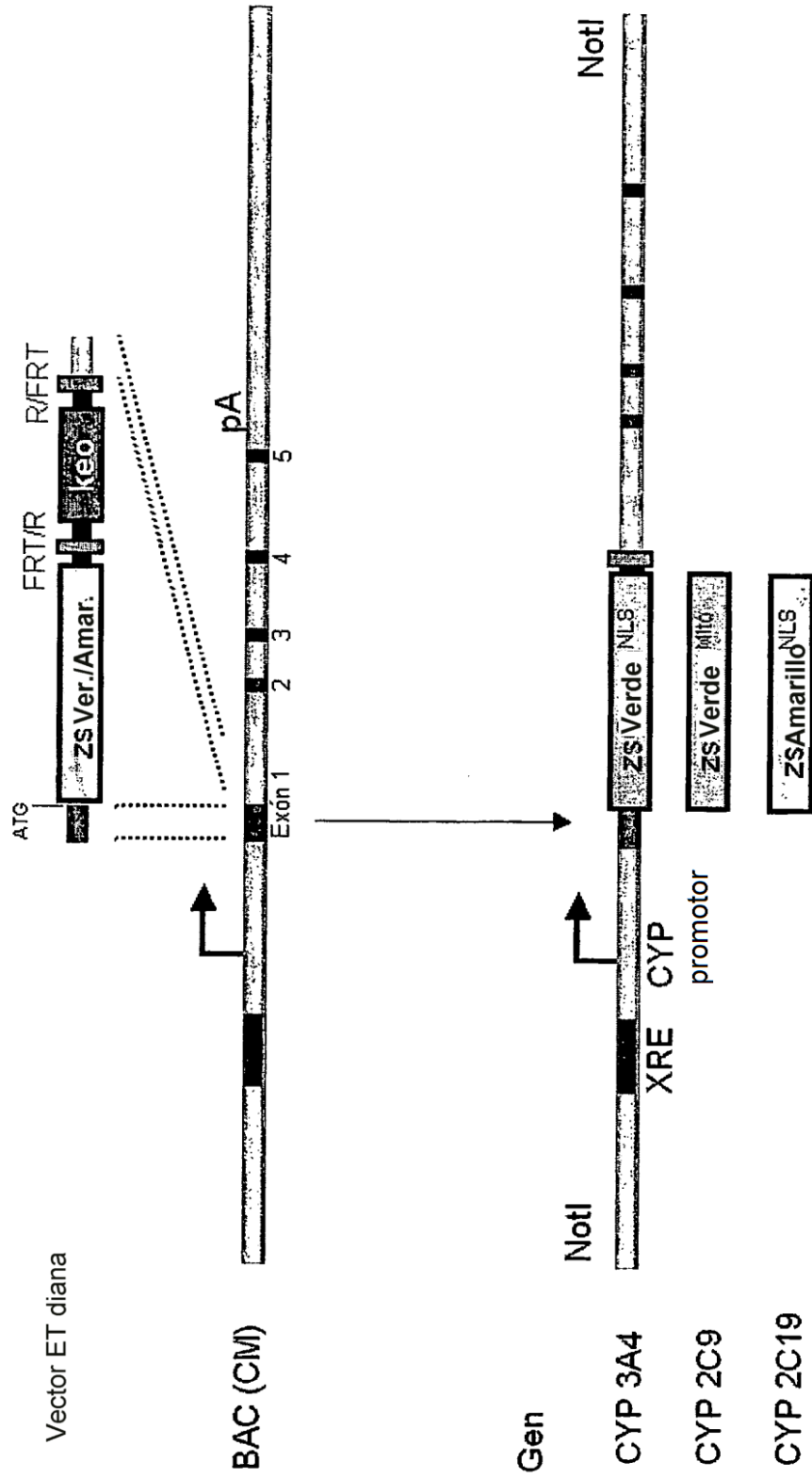


**FIG. 11 (Estrategia global para el cambio de grupo)**

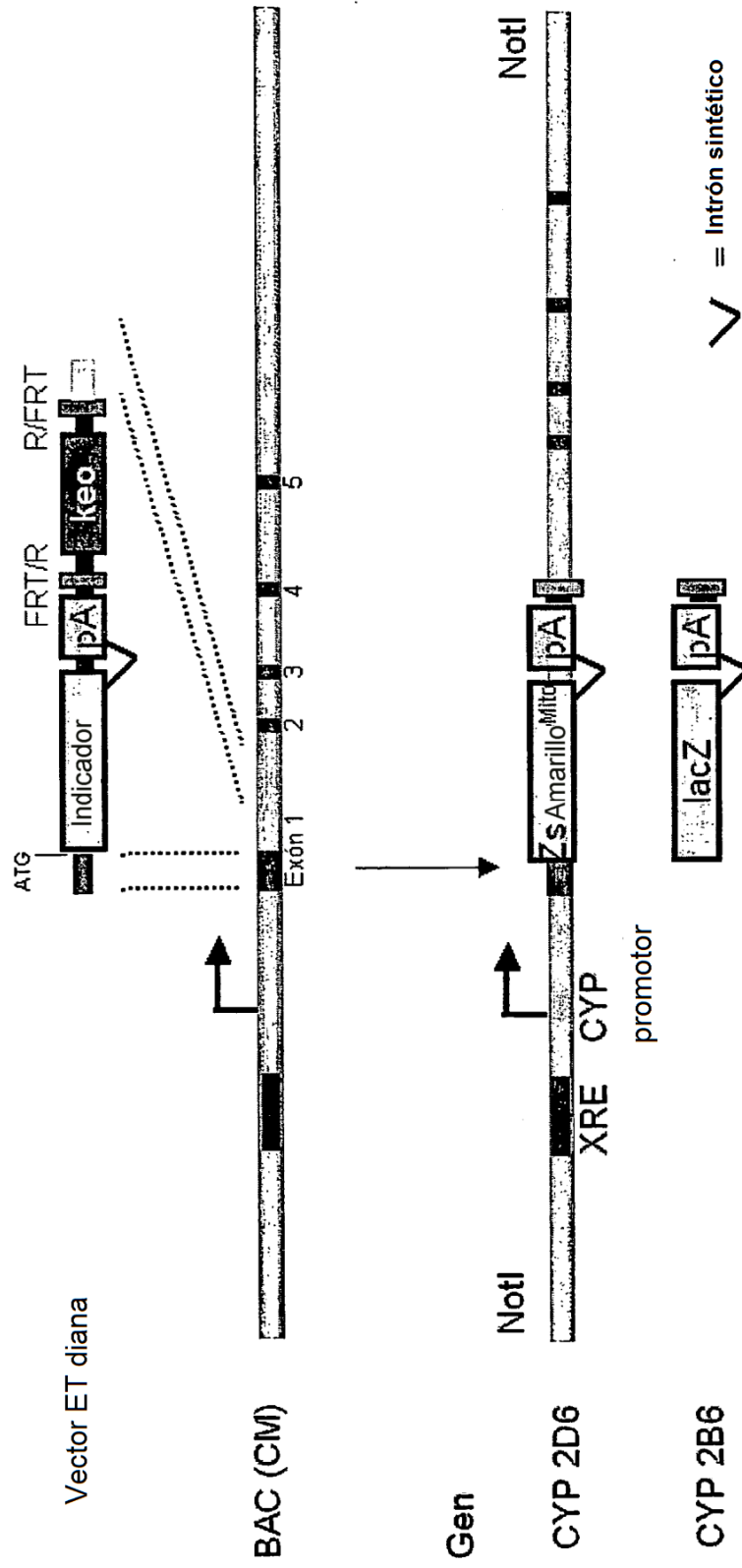




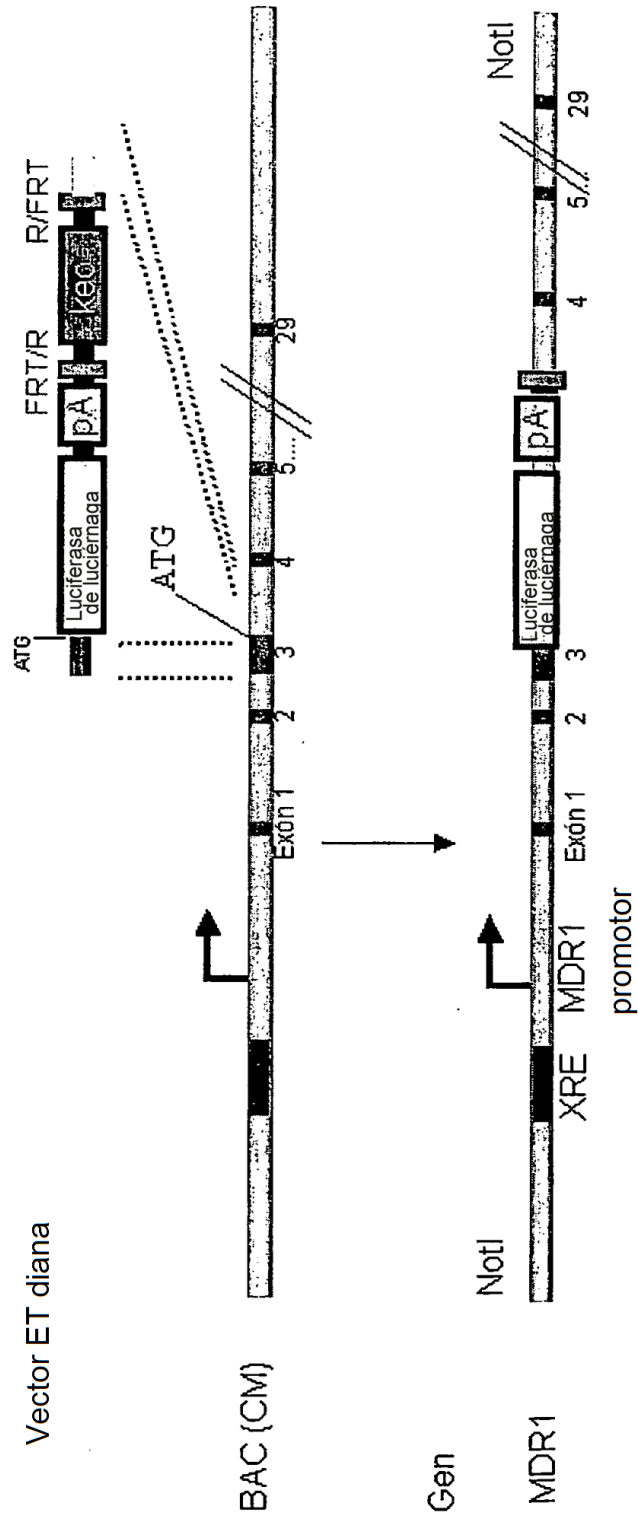
**FIG. 12 (Estrategia de proyecto con indicador)**



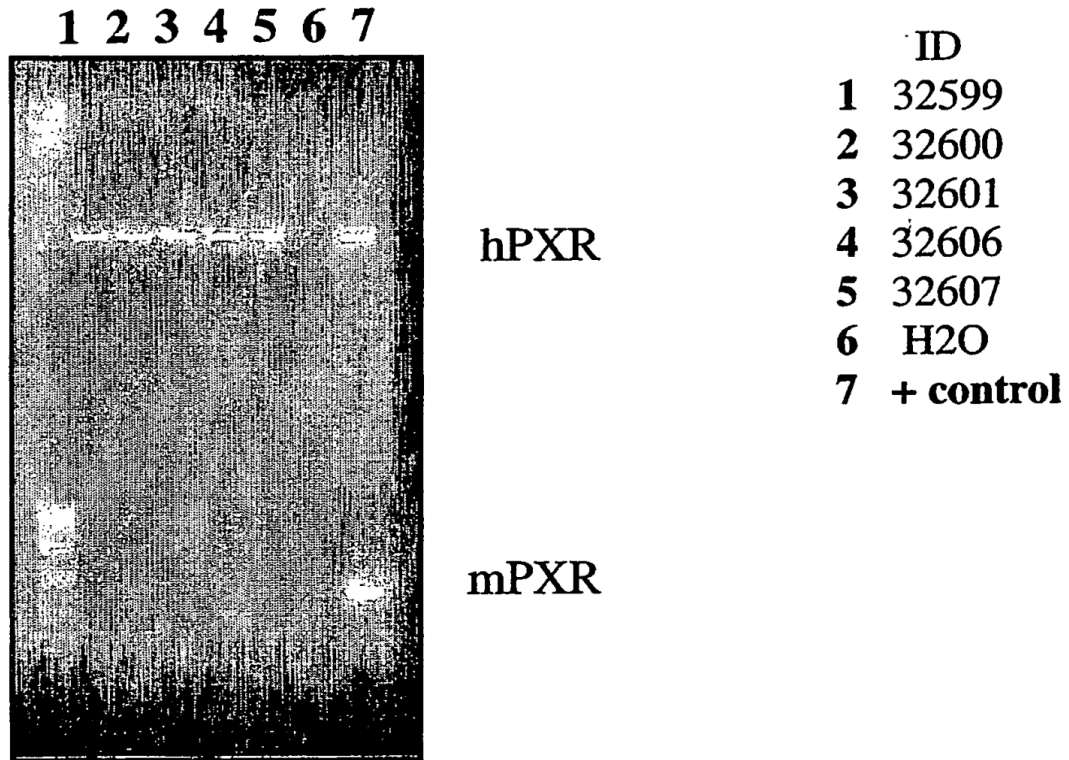
**FIG. 13 (Estrategia de proyecto con indicador para CYP2D6 y CYP2B6)**



**FIG. 14 (Estrategia de proyecto con indicador para MDR1)**



**FIG. 15** (Ejemplo de una PCR de tipificación de PXR)

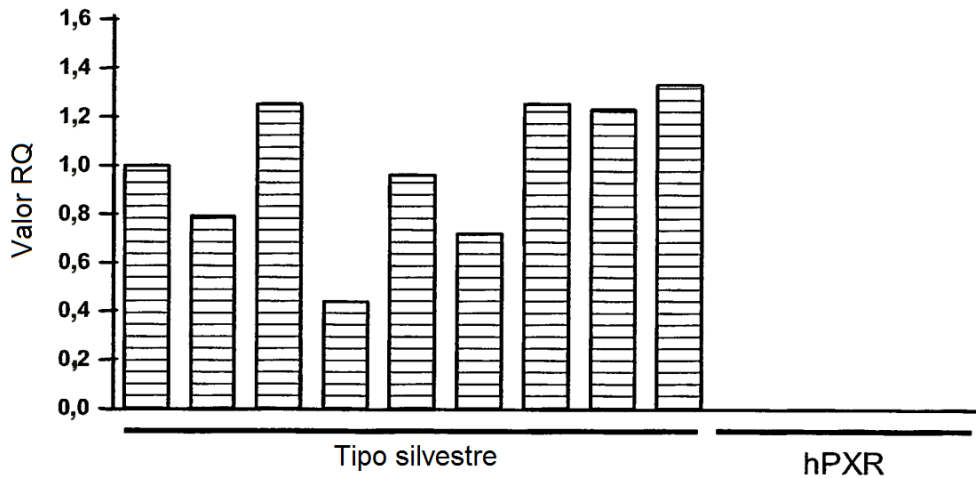


Combinaciones de cebadores	Genotipo detectado	Tamaño del fragmento esperado
PxTf1/PxTHr1	PXR humanizado	386 pb
PxTf1/PxTMr1	PXR de ratón	700 pb

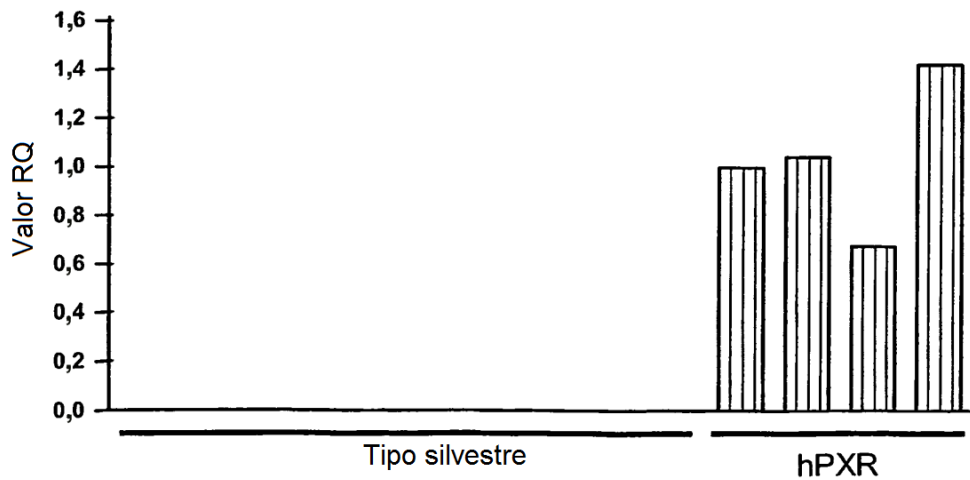
Gen	Ensayo genómico TaqMan® catálogo nº	Nº de lote del ensayo genómico TaqMan®
PXR humano	hPXR_Hs00243666_ml	295782
PXR de ratón	mPXR_Mn00803092_ml	295782
β-actina de ratón	β-actina_Mm607939_sl	312686

**Ensayos genómicos TaqMan® usados**

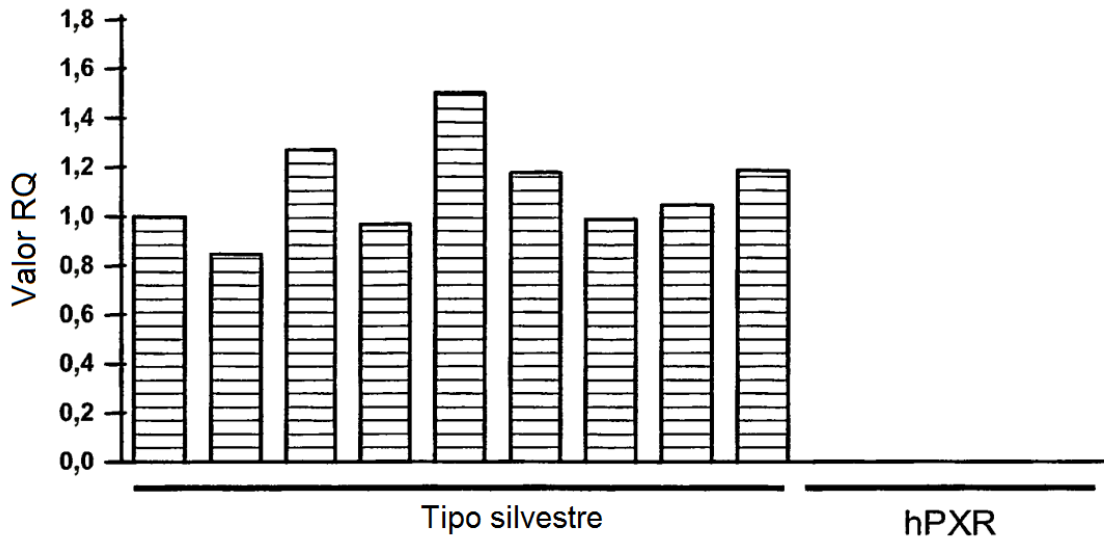
**FIG. 16A**



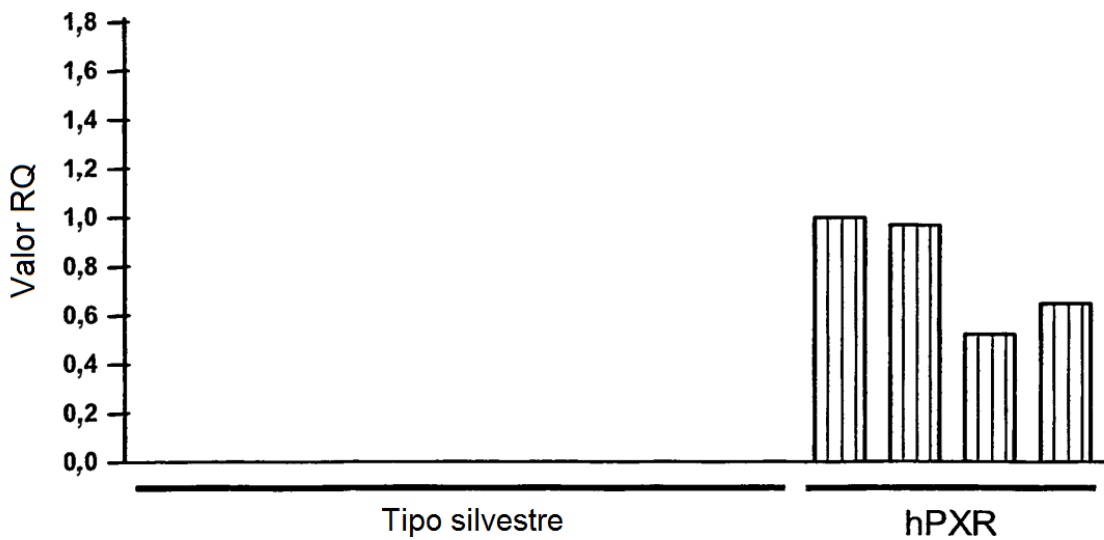
**FIG. 16B**

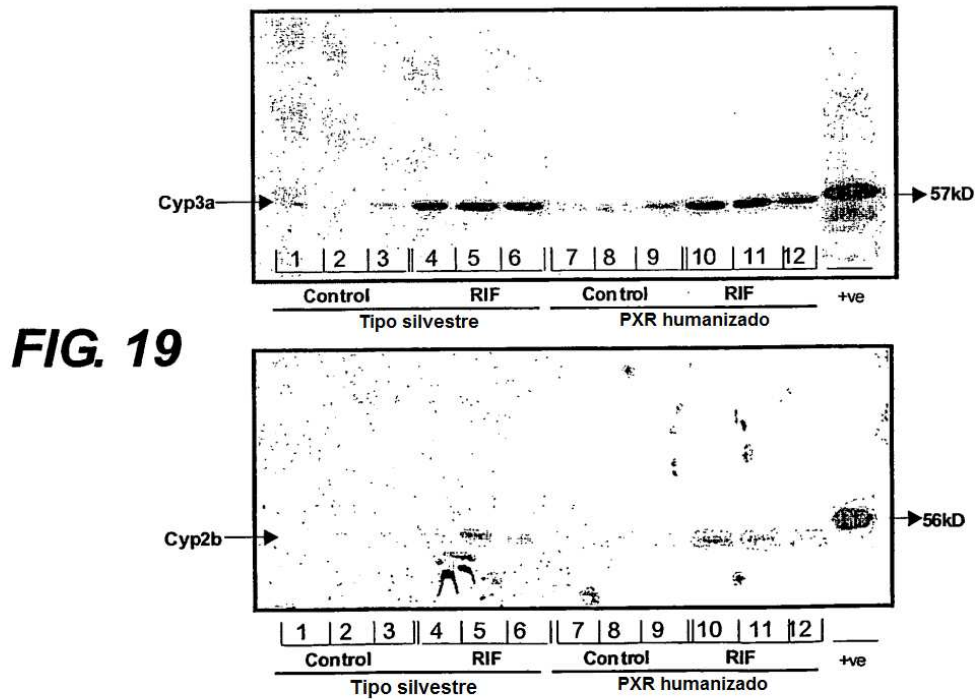
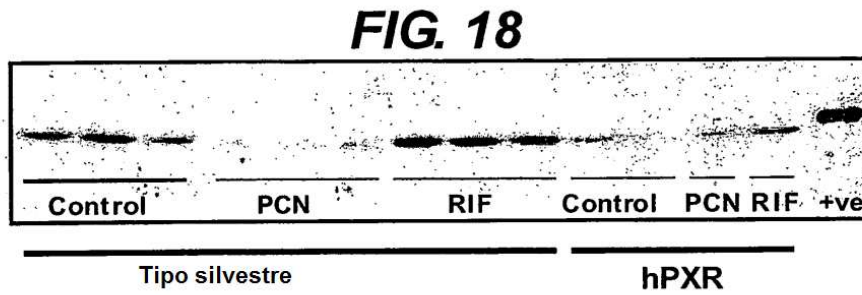
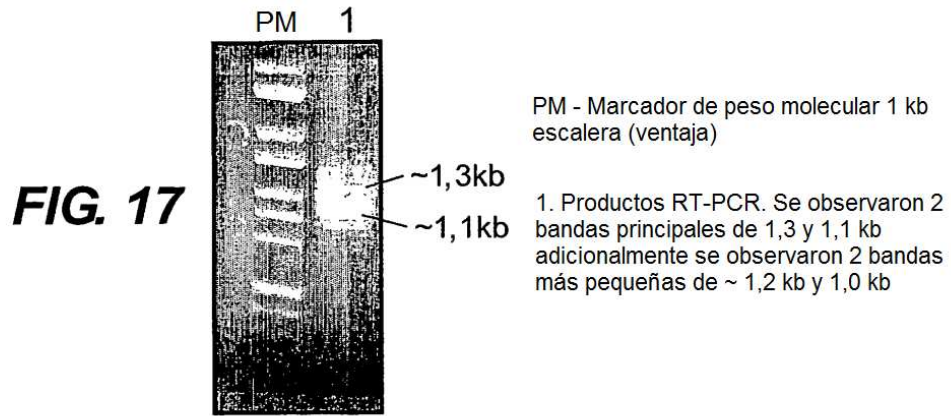


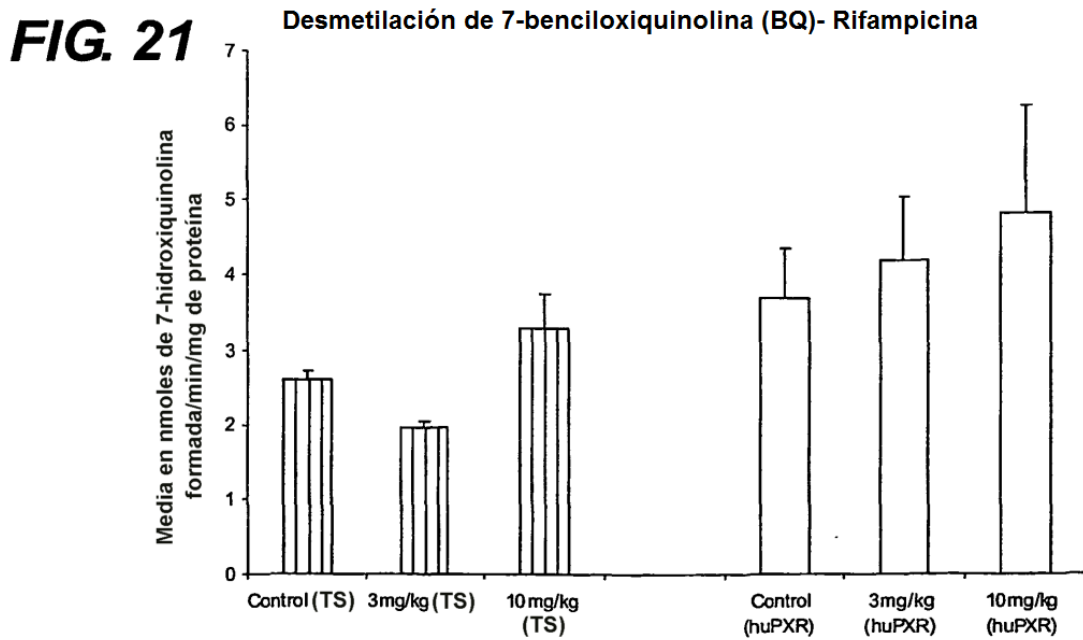
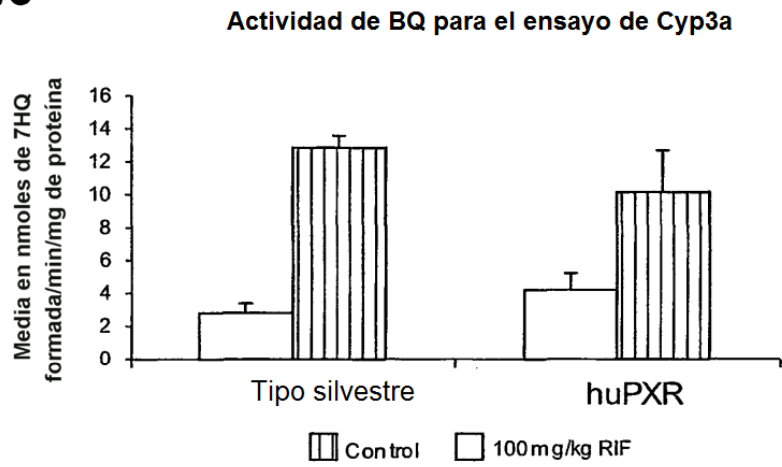
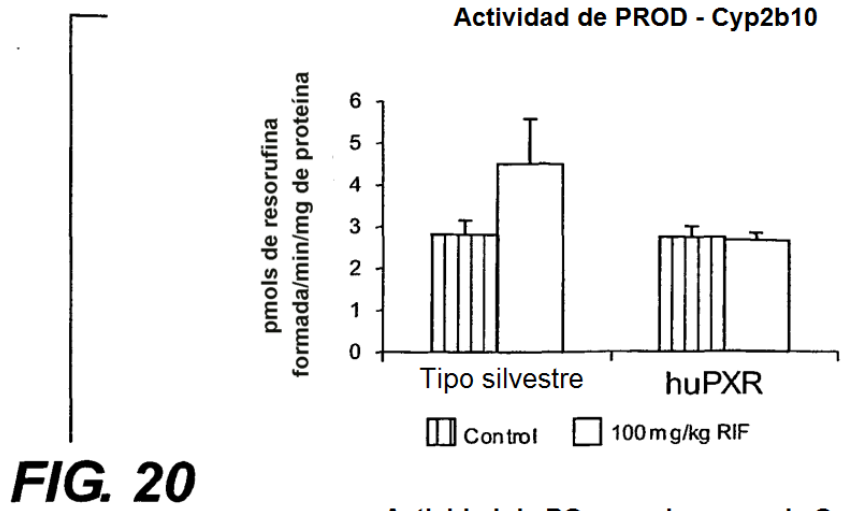
**FIG. 16C**



**FIG. 16D**



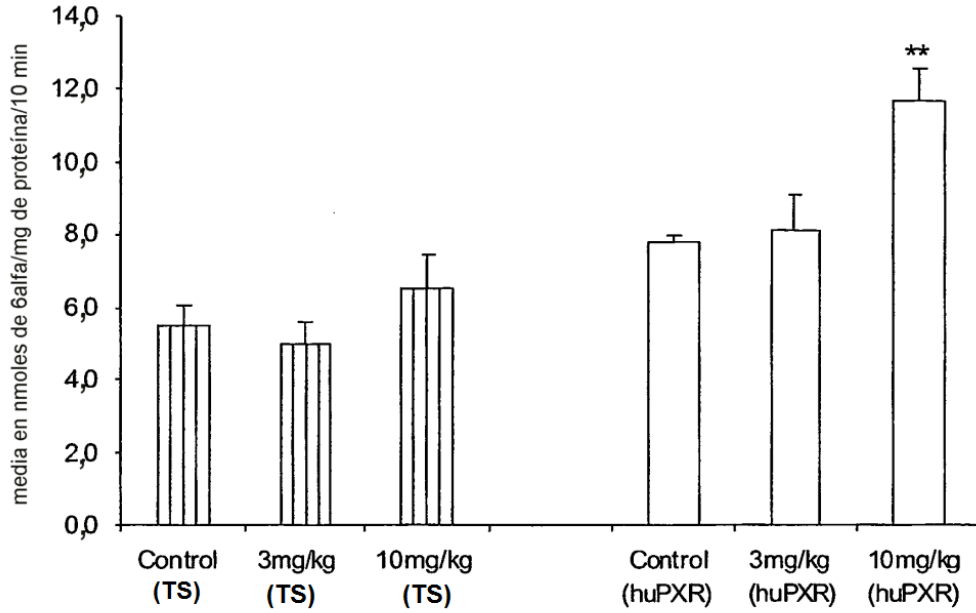






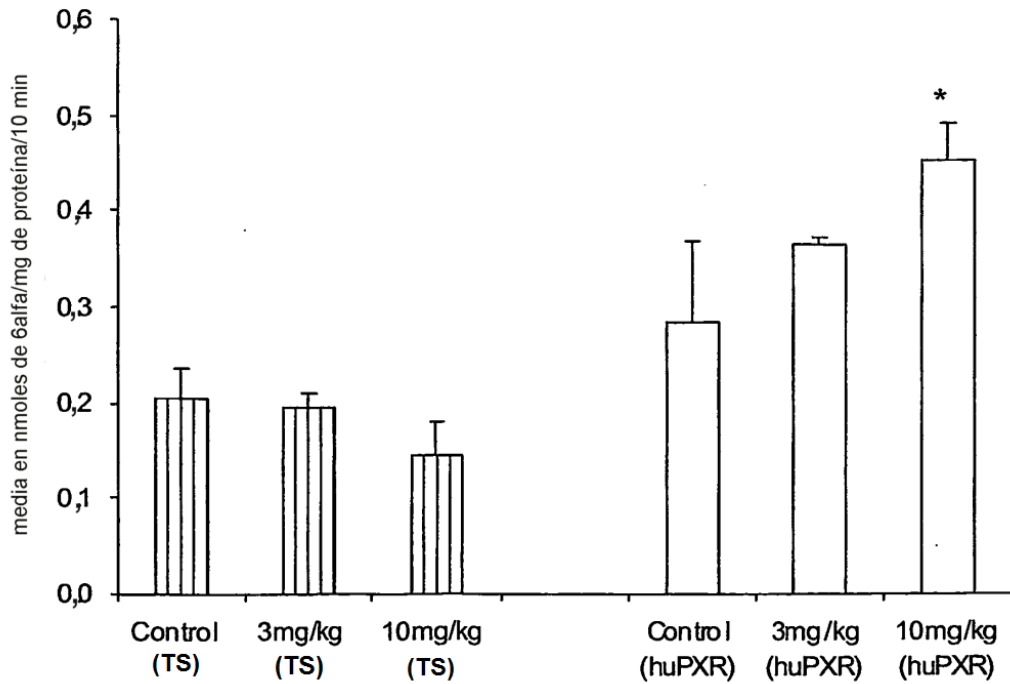
**FIG. 22**

6-beta hidroxilación de testosterona - Rifampicina



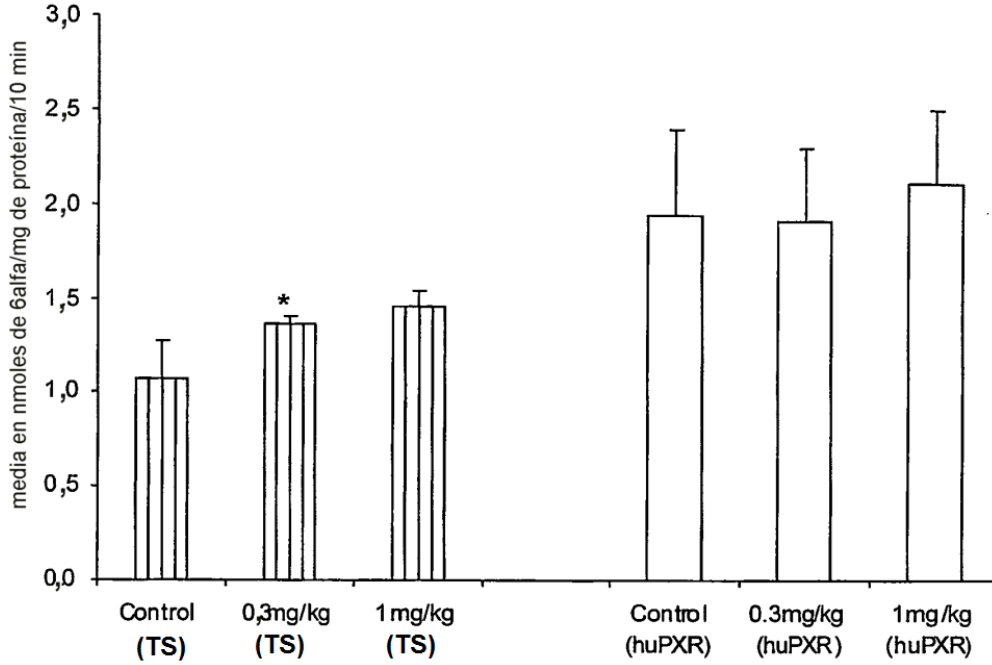
**FIG. 23**

16-beta hidroxilación de testosterona - Rifampicina



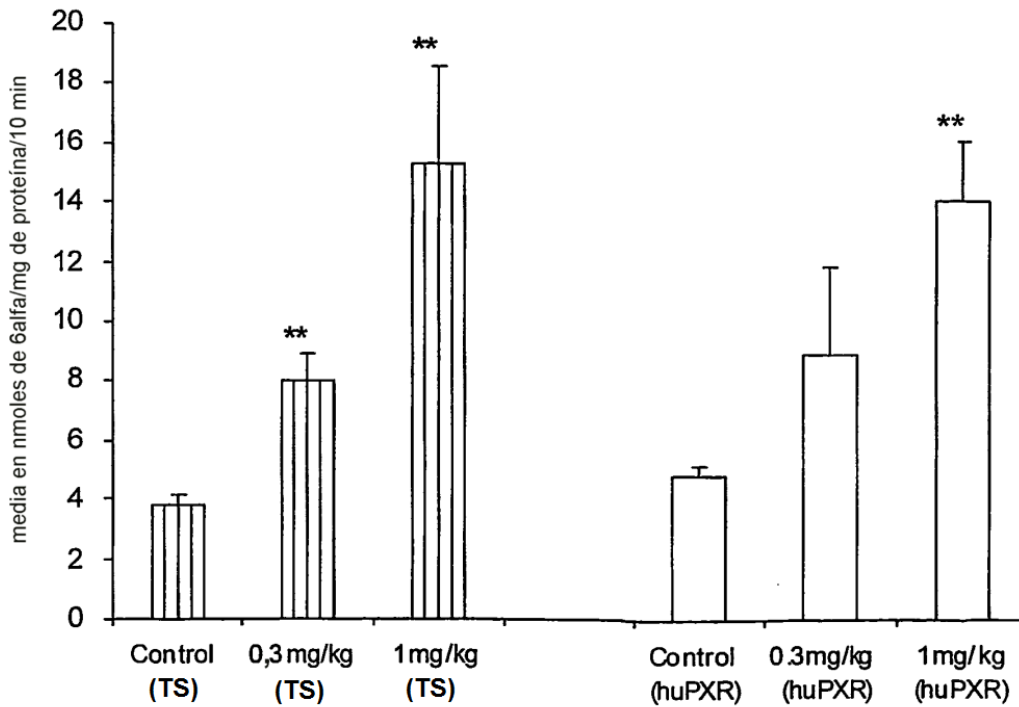
**FIG. 24**

7-alfa hidroxilación de testosterona - TCPOBOP



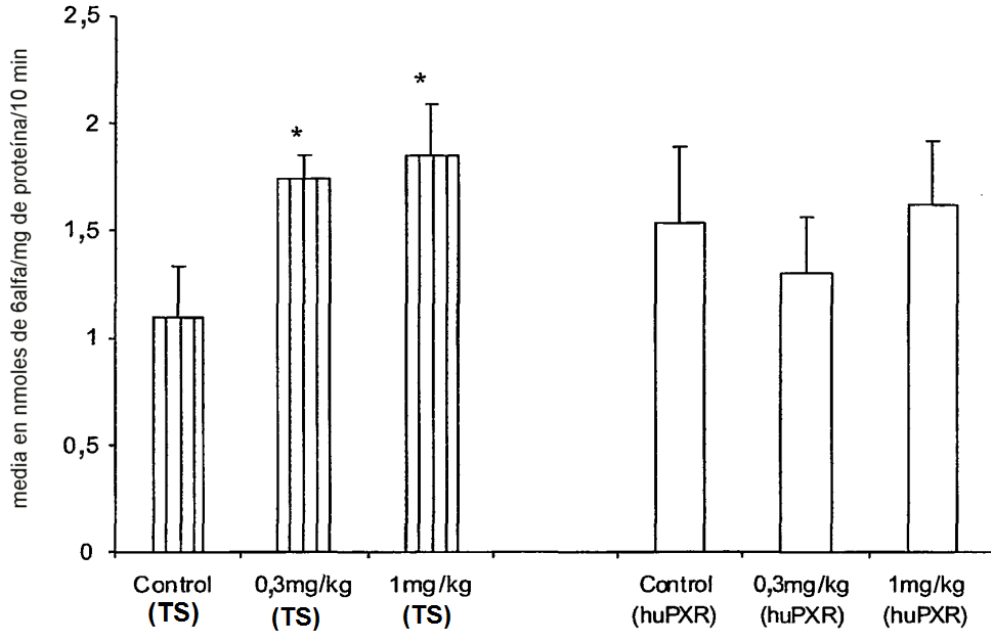
**FIG. 25**

6-beta hidroxilación de testosterona - TCPOBOP



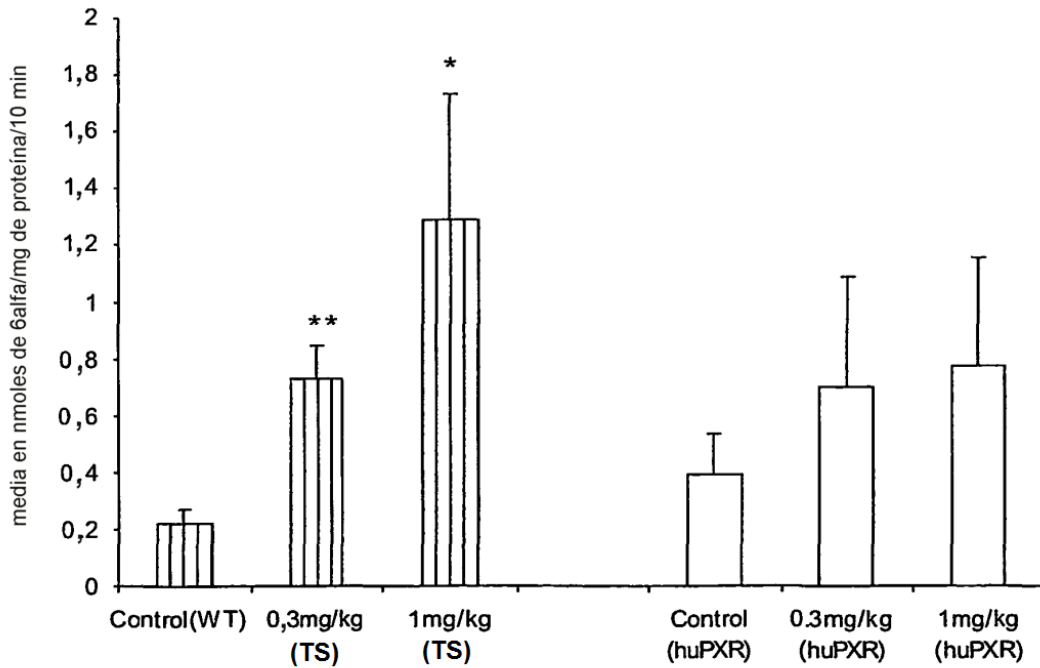
**FIG. 26**

16-alfa hidroxilación de testosterona - TCPOBOP



**FIG. 27**

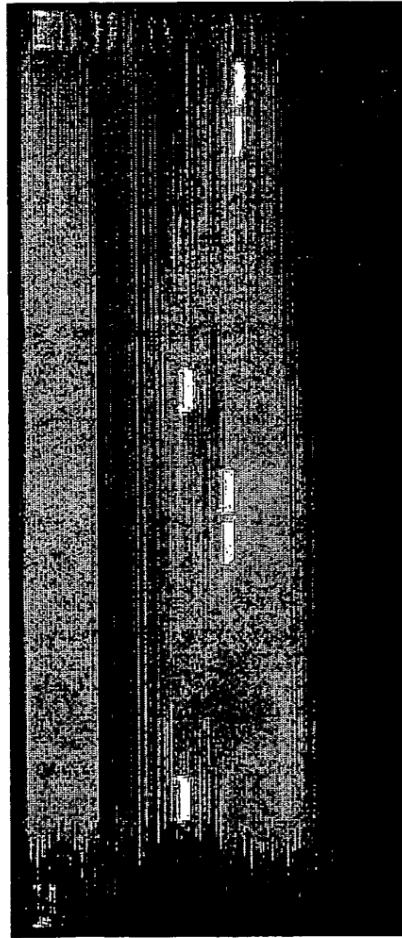
16-beta hidroxilación de testosterona - TCPOBOP



**FIG. 28**

Resultados PCR

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



M = Marcador

Nº	ADN	Nombre PCR	Alelo detectado	PCR SOP
1	Control(H <sub>2</sub> O) T s D42749 D42752	m PXR	PXR de ratón	1057
2				
3				
4				
5	Control(H <sub>2</sub> O) T s D42749 D42752	PXR humano diana	PXR humanizado	1058
6				
7				
8				
9	Control(H <sub>2</sub> O) T s D42749 D42752	mCAR	CAR de ratón	1062
10				
11				
12				
13	Control(H <sub>2</sub> O) T s D42749 D42752	CAR hum	CAR humanizado	1063
14				
15				
16				