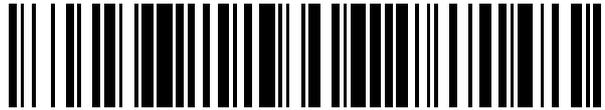


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 465**

21 Número de solicitud: 201330418

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.09.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (50.0%)

C. Escorxador, s/n

43003 Tarragona ES y

INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE

VIRGILI (50.0%)

72 Inventor/es:

JOVEN MARIED, Jorge;

ALONSO-VILLVERDE LOZANO, Carlos;

ARAGONÈS BARGALLO, Gerard;

RULL AIXA, Anna;

BELTRAN DEBÓN, Raúl y

RODRÍGUEZ GALLEGO, Esther

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **Ratones cisgénicos sobreproductores de MCP-1**

57 Resumen:

Ratones cisgénicos sobreproductores de MCP-1.

La presente invención se refiere a una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1, presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen mcp-1 de ratón, así como de progenies y líneas celulares derivadas. La presente invención también se refiere a la utilización de las mismas.

ES 2 497 465 A1

DESCRIPCIÓN

Ratones cisgénicos sobreproductores de MCP-1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de animales cisgénicos y uso de los mismos. En particular, la presente invención se refiere a ratones cisgénicos que sobreproducen MCP-1 útiles en el estudio de enfermedades como por ejemplo, la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

Antecedentes de la invención

La obesidad, y por tanto, las enfermedades asociadas, especialmente aterosclerosis, esteatosis hepática, resistencia a la insulina, o diabetes, constituye el principal problema al que se enfrenta la medicina moderna. Para comprender su patobiología, los conocimientos actuales obligan a que cualquier hipótesis debe considerar los mecanismos de regulación del sistema inmune y debe, en consecuencia, dirigirse al estudio del complejo entramado de las citoquinas. De este modo, los procesos inflamatorios se hacen patentes mediante la acción concertada de numerosas citoquinas, quimiocinas, hormonas y factores de transcripción que actúan en red, de forma que la respuesta de un elemento interfiere o activa otro.

Una de las citoquinas más importantes es la quimiocina MCP-1 (del inglés *monocyte chemotactic protein-1*) que se sabe que está relacionada con la presencia concomitante de hiperlipidemia, uno de los aspectos más frecuentes en la obesidad y la arteriosclerosis. La ausencia o deficiencia de MCP-1 tiene efectos relevantes en el reclutamiento de macrófagos y en la secreción de otras citoquinas. El papel relevante de MCP-1 en la génesis de la arteriosclerosis ha sido descrita y justificada por el hecho de que la deficiencia de MCP-1 disminuye de forma significativa la presencia de aterosclerosis en ratones genéticamente modificados (MCP-1^{-/-}). Recientemente se han descrito trastornos en el metabolismo de la glucosa y de las lipoproteínas derivados de la ausencia de MCP-1, es decir, parece haber una relación directa entre MCP-1 y la homeostasis energética. Datos recientes (véase, Rull A *et al.* Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. Cytokine 2009, 48:273-9) confirman que la ausencia de MCP-1 enlentece la progresión de la arteriosclerosis, previene la inducción de la obesidad,

evita la formación de esteatosis hepática y afecta notablemente a la resistencia a la insulina y el metabolismo hepático del colesterol.

5 Así pues, con el objetivo de estudiar más profundamente las bases moleculares y fisiopatologías del proceso inflamatorio en relación con enfermedades, tales como la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis, los presentes inventores han desarrollado un ratón cisgénico con un background genético C57BL6/J sobreproductor de MCP-1 en todos los tejidos del organismo.

10 Hasta la fecha los estudios planteados solamente buscaban respuestas desde la deficiencia de MCP-1, por lo que el objetivo del desarrollo de dicho ratón es estudiar el problema desde la posición contraria.

15 El documento US5817911 describe un animal no transgénico que sobreexpresa un gen responsable de la acumulación de monocitos y leucocitos. En particular, se indica que el transgen que se inserta expresa MCP-1 y más preferiblemente sobreexpresa MCP-1 en células epiteliales pulmonares de tipo II. Este animal se utiliza como modelo para ensayar fármacos para el tratamiento de enfermedades que dan lugar a una acumulación elevada de monocitos y/o linfocitos.

20 El documento WO9746664 describe un animal no humano (ratón) transgénico que expresa un transgen que codifica perlecan. Se menciona que este animal transgénico se puede aparear con otro animal transgénico que sobreproduce, entre muchas otras, la proteína MCP-1.

25 Ninguno de los modelos planteados hasta la fecha, presenta una sobreproducción de MCP-1 en todos los tejidos del organismo.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Genotipado de la cepa sobreproductora de MCP-1 (homocigoto (tgMCP-1^{+/+}); heterocigoto (tgMCP-1^{+/-})) y de un ratón salvaje (WT). WM: marcador de peso molecular.

Figura 2A. Concentración de MCP-1 en diferentes tejidos del modelo animal tgMCP-1^{+/-}, obtenidos mediante ELISA. (TABe: Tejido adiposo blanco epididimal, TABi: Tejido adiposo blanco inguinal, TAM: Tejido adiposo marrón).

35 Figura 2B. Concentración de MCP-1 en suero y plasma del modelo animal tgMCP-1^{+/-}.

Figura 3. Control del aumento de peso y de la ingesta de alimento en un estudio de intervención dietética llevado a cabo en la cepa sobreproductora de MCP-1 de 32 semanas de edad.

5 Figura 4. Concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos en las distintas cepas estudiadas y con distinto tratamiento dietético a las 16 semanas de edad.

Figura 5. Test de tolerancia a la glucosa en las distintas cepas y diferentes intervenciones dietéticas.

Figura 6. Peso relativo de los órganos metabólicos más importantes. eWAT: tejido adiposo blanco epididimal. iWAT: tejido adiposo blanco inguinal. BAT: Tejido adiposo marrón.

10 Figura 7. Cortes histológicos hepáticos observados en microscopio óptico (20x). Se observan las imágenes según los diferentes tratamientos dietéticos y las diferentes cepas (homocigoto +/+ y heterocigoto +/-) en ratones tratados durante 16 semanas. CD =dieta Chow; HF = Dieta rica en grasas

15 Figura 8. Cortes histológicos hepáticos observados en microscopio óptico (20x). Se observan las imágenes según los diferentes tratamientos dietéticos y las diferentes cepas (homocigoto +/+ y heterocigoto +/-) en ratones tratados durante 24 semanas. CD =dieta Chow; HF = Dieta rica en grasas

20 Figura 9. Cortes histológicos hepáticos observados en microscopio óptico (20x). Se observan las imágenes según los diferentes tratamientos dietéticos y las diferentes cepas (homocigoto +/+ y heterocigoto +/-) en ratones tratados durante 32 semanas. CD =dieta Chow; HF = Dieta rica en grasas

Figura 10. Cortes histológicos hepáticos observados en microscopio óptico (4x, 20x y 40x). Se observan imágenes de ratones tgMCP-1^{+/+} alimentados con dieta rica en grasa durante 32 semanas.

25 Figura 11. Cortes histológicos hepáticos en microscopía electrónica de ratones sobreproductores de MCP-1 de los distintos grupos dietéticos a las 24 semanas de edad. Las flechas muestran distintas mitocondrias. A. Cepa heterocigota alimentada con una dieta normal. B. Cepa homocigota alimentada con una dieta normal. C. Cepa heterocigota alimentada con una dieta rica en grasa. D. Cepa homocigota alimentada con una dieta rica en grasa.

30 Figura 12. Esquema del vector insertado en el Locus ROSA26. La secuencia de STOP, flanqueada por sitios de restricción loxP, se encuentra entre el promotor (UbiC) y el gen de MCP-1 (representado por sus tres exones: 1, 2 y 3). Los elementos PGK, Neo y SDIS, solamente son necesarios para la selección de clones.

35

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1 (tgMCP-1), cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1, presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* de ratón introducido mediante transgénesis o intragénesis.

La presente invención también se refiere a una línea celular derivada de una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1 (tgMCP-1), cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1, presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* de ratón introducido mediante transgénesis o intragénesis.

La presente invención también se refiere a una progenie de una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1 (tgMCP-1), cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1, presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* de ratón introducido mediante transgénesis o intragénesis.

Por “animal cisgénico” o “ratón cisgénico” se entiende en la presente invención, un organismo (animal, preferiblemente ratón) que contiene en su genoma fragmentos de ADN de su misma especie pero que ha sido obtenido mediante ingeniería genética.

El ratón desarrollado en la presente invención es un ratón que además de conservar la proteína natural (wild type, cromosoma 11), posee otra copia en otro locus genético (ROSA26, cromosoma 6) regulada por un potente promotor (promotor de la ubiquitina) en un background genético que es C57BL/6J.

El desarrollo de la cepa de ratones de la presente invención se basa en la tecnología Cre/Lox, ampliamente utilizada en el diseño de ratones transgénicos inducibles. Los ratones transgénicos inducibles son ratones en los que se puede activar la expresión de un gen de forma ubicua o en tejidos concretos, como en hígado, páncreas o linfocitos T.

Para producir una cepa de ratones Cre-Lox, normalmente se cruza un ratón *cre* con un ratón *loxP*. El ratón *cre* contiene el transgen de recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico de tejido, el ratón *loxP* contiene dos sitios *loxP* flanqueando el segmento genómico de interés (floxed locus).

Cre (cyclization recombinase) es una recombinasa que es capaz de recombinar específicamente entre pares de dianas *loxP*. Así pues, se puede utilizar para eliminar secuencias comprendidas ente sitios *loxP*, invertirlas, o producir translocaciones.

5

Dependiendo de los promotores y otros controles regulatorios, los ratones *cre* pueden ser diseñados para expresar la recombinasa Cre solo bajo algunas condiciones como:

- en algunos tejidos
- cuando la dieta del ratón se suplementa con ciertas sustancias como doxiciclina, tetraciclina, tamoxifeno, etc...

10

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigoto, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, que comprende las etapas de:

15

- a) introducir la secuencia del gen de *mcp-1* de ratón C57BL6/J en un plásmido para su clonación;
- b) transferir el fragmento de ADN clonado de forma homocigota a ovocitos fertilizados de ratones C57BL6/J para producir descendientes;
- c) analizar dichos descendientes para evaluar la existencia del gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis.

20

La estrategia a seguir ha sido la de colocar una secuencia STOP flanqueada por sitios *loxP* entre el promotor y el transgen, para poder eliminarla específicamente activando la transcripción del transgen de MCP-1, de forma general o en tejidos específicos. La estructura básica del inserto se muestra en la figura 12.

25

El promotor de la Ubiquitina produce una alta expresión en ratones transgénicos.

30

El fragmento del gen se clona mediante PCR del DNA genómico de C57BL/6. El gen de MCP-1 se encuentra en el cromosoma 11. Consta de tres exones repartidos en aproximadamente 3kb. Normalmente, se inserta el cDNA, pero en este caso se ha copiado el DNA genómico.

35

Una secuencia STOP flanqueada por dianas loxP contiene las señales que impiden la transcripción del transgen inducida por el promotor UbiC. Esta secuencia STOP es la que puede eliminarse mediante la recombinasa Cre, dando lugar a la expresión del transgen.

- 5 El lugar donde se clonará este vector en el genoma del ratón será en el locus ROSA26 que se encuentra en el cromosoma 6.

Es conocido que el locus de ROSA26 es un sitio de integración adecuado ya que permite una fuerte y predecible expresión de transgenes que lleven promotores exógenos.

10

Por ejemplo, si se tiene un ratón transgénico heterocigoto, y se cruza con un ratón homocigoto para Cre, la descendencia será siempre Cre^{+/-} (heterocigoto), así que, los individuos que hereden el alelo transgénico sobreexpresarán MCP-1 (en este caso).

- 15 Además del modelo Cre general, existen los modelos Cre específicos de tejido.

Una vez diseñado y generado el vector, se introduce en células madre embrionarias previamente aisladas mediante electroporación.

- 20 El inserto, una vez dentro del núcleo de la célula, se integra en el cromosoma mediante recombinación homóloga.

Las células madre embrionarias (ES) transformadas se cultivan y seleccionan.

- 25 Una vez seleccionados los clones mediante southern blot, estas células madre embrionarias se transfieren al interior de un blastocisto y éste se implanta en el útero de una madre receptora.

- 30 De esta, nacerán las quimeras que podrán dar lugar a la descendencia transgénica (si alguna de estas células portadoras del transgen ha ido a desarrollar las gónadas).

La primera generación que se obtiene son animales quimeras, ya que tienen dos tipos de células con material genético diferente. Difieren en que unas células son portadoras del vector y otras no.

35

Estas quimeras (normalmente todas del mismo sexo), son cruzadas con animales del mismo background genético (C57BL/6) y la descendencia (offspring) que de ellos derive, serán los primeros animales transgénicos heterocigotos.

5 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la utilización de una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

10

La presente invención también se refiere a la utilización de una o más líneas celulares derivadas de la cepa de ratones según la presente invención con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido
15 mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

15

La presente invención también se refiere a la utilización de una progenie de una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de
20 MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

20

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la utilización de una cepa de
25 ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis, en la identificación de compuestos eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la
30 esteatosis hepática o la aterosclerosis.

30

La presente invención también se refiere a la utilización de una o más líneas celulares derivadas de la cepa de ratones según la presente invención con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células
35 somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la

35

esteatosis hepática o la aterosclerosis, en la identificación de compuestos eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

- 5 La presente invención también se refiere a la utilización de una progenie de cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* introducido mediante transgénesis o intragénesis, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis, en la identificación de compuestos
- 10 eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

Ejemplos

Caracterización

- 15 *Genotipado de la cepa*

Las técnicas de genotipado se realizan para establecer la cepa y, además, durante los diferentes estudios para llevar un control de la pureza genética de los ratones (control de calidad). El método de genotipado que se ha utilizado en el laboratorio para el desarrollo de

20 la presente invención no causa ningún tipo de dolor al animal.

En primer lugar, se selecciona el ratón en cuestión para su identificación. Para ello, se le realiza un pequeño agujero en el borde exterior de una de las orejas, obteniendo el tejido taladrado. Se realiza la extracción del ADN del animal a partir del tejido y se lleva a cabo

25 posteriormente una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Este método sirve para amplificar una región determinada del ADN y poder usar estas regiones para identificar o caracterizar cada cepa.

Para este fin, son necesario unos cebadores (*primers*) concretos, es decir un conjunto de

30 nucleótidos que se añaden a la reacción y que realizan la amplificación de una región determinada del ADN. Estos cebadores se seleccionan cuidadosamente para que la reacción sea lo más específica posible.

Cabe destacar que los animales tienen una reproducción y cría normal, obteniéndose fetos

35 viables y fértiles.

Tabla 1 Cebadores utilizados para el genotipado de la cepa sobreproductora de MCP-1

5

| | | |
|--------|------------------------------|--|
| F_WTTG | 5'- GCACTTGCTCTCCCAAAGTC -3' | 5' Homology arm primer |
| R_WT | 5'- AGACTCCCGCCCATCTTC -3' | 3' Homology arm primer - para detectar wt, dará una banda con el 5' homology arm primer de 235 bp |
| R_Cre | 5'-AGGCAAATTTTGGTGTACGG-3' | Secuencia Cre- para detectar el alelo Cre, dará una banda con el 5' homology arm primer de 773 bp |
| R_TG | 5'- TCCGCTCTCTGGAAAGAAAA -3' | Promoter primer - para detectar el transgénico, dará una banda con el 5' Homology arm primer de 478 bp |

10

En el genotipado se demuestra que las cepas son homocigotas de MCP-1 y que además no tienen ningún tipo de problema en la reproducción, ya que los fetos se desarrollan correctamente y son fértiles.

ELISA de MCP-1

15

La técnica de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima capaz de generar un producto detectable mediante colorimetría, fluorescencia o luminiscencia.

20

Para la realización de este ensayo, se requiere una preparación previa de la placa con el anticuerpo de captura. Una vez superado el tiempo de incubación, se procede a un lavado de la placa y se añade la solución de tampón de bloqueo.

25

Una vez realizado el segundo lavado, se añaden las diferentes muestras según un previo diseño en plantilla. Pasadas unas 2 horas, se procede a un siguiente lavado y posteriormente se añade el anticuerpo de detección en cada pocillo. Dos horas después se lava de nuevo la placa y se añade un conjugado de avidina-peroxidasa.

30

Por último, se lava de nuevo la placa, se añade el sustrato líquido ABTS, se deja actuar unos 20 minutos y se procede a la lectura de la placa.

35

Cabe indicar que en el ELISA de tejidos, éstos deben ser previamente homogenados y a partir de ahí se procede a la cuantificación de proteína de cada homogenado obtenido mediante el método de cuantificación Bradford. De esta manera, se consigue que la muestra que se añade a cada pocillo de la placa sea similar en concentración proteica y, por tanto, se puedan comparar los resultados.

Las figuras 2A y 2B muestran la sobreexpresión de MCP-1 en la cepa sobreproductora de dicha quimiocina en comparación con una cepa de control. Se observa la presencia de una mayor concentración de MCP-1 en suero, plasma y tejidos.

5 *Evolución de peso e ingesta*

10 Cuando los modelos homocigoto y heterocigoto de la cepa sobreproductora de MCP-1 son alimentados con una dieta normal no existen diferencias de peso significativas. No obstante, si la dieta administrada es una dieta rica en grasa la variante homocigota aumenta su peso significativamente respecto a la otra variante (figura 3). Este hecho podría deberse a una ingesta de alimentos superior, pero como se puede observar ambas variantes obtienen la misma energía a partir de los alimentos ingeridos.

15 Además del significativo aumento de peso, destaca un aumento en el tejido adiposo, un aumento en el peso hepático y la disminución del peso relativo del páncreas.

Análisis bioquímicos

20 El suero de cada animal fue analizado con el analizador automático Cobas para determinar las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos.

25 En la figura 4 se recogen los datos de ratones control (cepa *wild-type*) y ratones sobreproductores de MCP-1 (tanto de la cepa homocigota como heterocigota) a las 16 semanas de edad.

Los resultados muestran que entre los distintos grupos estudiados no existen diferencias en las concentraciones de colesterol. Únicamente se observa un efecto de la dieta ya que la ingesta de una dieta rica en grasa aumenta los niveles de colesterol en suero en todos los grupos.

30 Por otro lado, las concentraciones séricas de triglicéridos muestran una ligera tendencia a ser inferiores en las cepas sobreproductoras de MCP-1, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Además, el efecto de la dieta es opuesto al de concentraciones de colesterol. En este caso, la ingesta de una dieta rica en grasa disminuye los niveles de triglicéridos en suero y se puede entrever la misma tendencia que en el caso de la dieta normal.

35

Test de tolerancia a la glucosa

5 Para evaluar la capacidad de los animales para metabolizar la glucosa, se realiza el test de tolerancia a la glucosa.

10 La prueba consiste en, primeramente, medir la glucosa basal del ratón. A continuación, se le inyecta una dilución de glucosa en agua (cantidad estipulada según el peso de cada ratón). Seguidamente, se debe medir la concentración de glucosa en sangre a distintos intervalos de tiempo llegando a alcanzar las dos horas. Esto se hace a partir de una pequeña incisión en la cola del animal, extrayendo una gota de sangre y analizándola con el medidor automático de glucosa *Accu-check*.

15 El tratamiento con una dieta rica en grasa aumenta el área bajo la curva en todas las cepas, es decir, una ingesta de nutrientes excesiva conlleva resistencia a la insulina. Si comparamos cepas con el mismo tratamiento dietético, esta resistencia es mayor en el modelo sobreproductor de MCP-1 que en ratones deficientes para el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (modelo de hiperlipidemia, figura 5).

20 *Órganos metabólicos*

Al realizarse el sacrificio del animal, se extraen los órganos y se pesan. En la figura 6 se recogen los pesos de los órganos metabólicos de las cepas en estudio corregidos según el peso del animal.

25 En el caso del hígado y del músculo no se observan diferencias entre las distintas cepas estudiadas ni un efecto de la dieta rica en grasa en ninguno de los grupos estudiados. Aun así, el volumen del hígado es mucho mayor en las cepas sobreproductoras.

30 A excepción del tejido adiposo marrón, el peso relativo de los distintos tejidos adiposos aumenta significativamente cuando los animales son alimentados con una dieta rica en grasa destacando la cepa sobreproductora de MCP-1 homocigota (tgMCP-1^{+/+}) en la que este aumento de peso es significativamente distinto a las otras cepas.

35 Los resultados obtenidos en el caso del páncreas son peculiares ya que cuando los animales son alimentados con una dieta normal el peso relativo de este órgano es menor en

las cepas sobreproductoras de MCP-1. Con una dieta rica en grasa su peso aumenta en la cepa control y la cepa heterocigota siendo en ésta menor que en la primera, pero disminuye en la cepa homocigota.

5 *Histología hepática*

La obtención de muestras se realizó a las 16, 24 y 32 semanas de estudio de diferentes grupos de ratones. Los tejidos hepáticos destinados a histología se conservaron en tubos con formol. Posteriormente, se procesaron estos tejidos y se incluyeron en parafina para poder realizar cortes de 2 μm de grosor en el micrótomo.

Una vez obtenidos los cortes, se realizó un protocolo determinado para teñir los cortes con hematoxilina (colorante básico que tiñe, por ejemplo, los núcleos) y eosina (colorante ácido).

15 En las figuras 7, 8 y 9 se observan los cortes histológicos de los diferentes grupos de ratones según el tratamiento dietético administrado (CD: dieta chow, HF: dieta elevada en grasas), la cepa de ratones tgMCP-1^{+/+} (homocigoto) o tgMCP-1^{+/-} (heterocigoto) y las semanas de estudio.

20 Se observan grandes diferencias en la evaluación de la esteatosis (presencia de grasa en el hígado) en los diferentes grupos estudiados. Se aprecia una mayor presencia de vesículas lipídicas en los grupos alimentados con una dieta rica en grasa y esta presencia se hace más evidente en los grupos tgMCP-1^{+/+}.

25 Además, el porcentaje de grasa aumenta según se alargan las semanas de estudio, siendo 16 semanas el grupo con menos presencia de grasa y 32 semanas el grupo con más presencia de grasa (véase la figura 10).

30 La histología hepática depende del tiempo y también de la dieta, es decir, cuanto mayor tiempo se alimenta el ratón con dieta rica en grasa, más grasa hepática acumula.

Cortes histológicos de corazón

35 Se realizaron cortes histológicos de los corazones de los ratones. Se efectuó una fijación con sacarosa y OCT para mantener la integridad de las membranas y estructuras internas del corazón para posteriormente cortarlos con el criostato. Una vez cortado y depositado en

los portaobjetos, se realizó la tinción con Sudan IV (específica para lípidos) para observar la posible placa de ateroma. En las imágenes obtenidas se observó que en animales sometidos a dieta rica en grasa, no se observa en coronarias miocárdicas de mediano calibre, placa de ateroma con tinción Sudán para lípidos.

5

Observación de mitocondrias mediante microscopía electrónica

Se ha llevado a cabo la observación de tejido hepático de los distintos grupos dietéticos de las dos cepas sobreproductoras de MCP-1 con el fin de realizar una evaluación cualitativa (morfología) y cuantitativa de las mitocondrias.

10

La obesidad es el resultado de un exceso de almacenamiento de energía y/o un defecto de gasto de energía que conduce a la mayor incidencia de factores de riesgo cardiovascular que favorecen el desarrollo de complicaciones vasculares. La mitocondria es el orgánulo celular cuya función es la gestión de la energía celular. De ahí que la disfunción de este orgánulo sea importante en la fisiopatología de la obesidad y todas sus consecuencias metabólicas.

15

En la figura 11 se observa que los animales homocigotos tienen una morfometría anormal de las mitocondrias, así como menor cantidad de éstas en la dieta rica en grasa.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1, cisgénica y homocigota, sobreproductores de MCP-1 presente tanto en células somáticas como germinales, que contiene en su genoma un gen *mcp-1* de ratón.
- 2.- Línea celular derivada de una cepa de ratones según la reivindicación 1.
- 10 3.- Progenie de una cepa de ratones según la reivindicación 1.
- 4.- Utilización de una cepa de ratones según la reivindicación 1, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.
- 15 5.- Utilización de una o más líneas celulares según la reivindicación 2, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.
- 6.- Utilización de una progenie según la reivindicación 3, como modelo para el estudio de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.
- 20 7.- Utilización de una cepa de ratones según la reivindicación 1 en la identificación de compuestos eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.
- 25 8.- Utilización de una o más líneas celulares según la reivindicación 2, en la identificación de compuestos eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.
- 30 9.- Utilización de una progenie según la reivindicación 3, en la identificación de compuestos eficaces como antagonistas de CCR2 para el tratamiento de la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

Figura 1

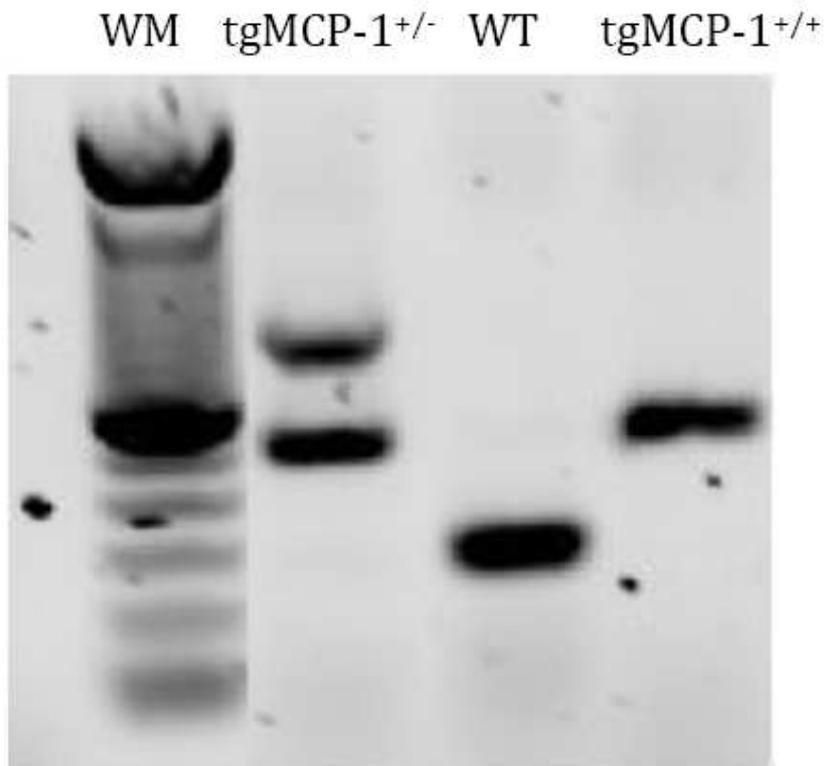


Figura 2A

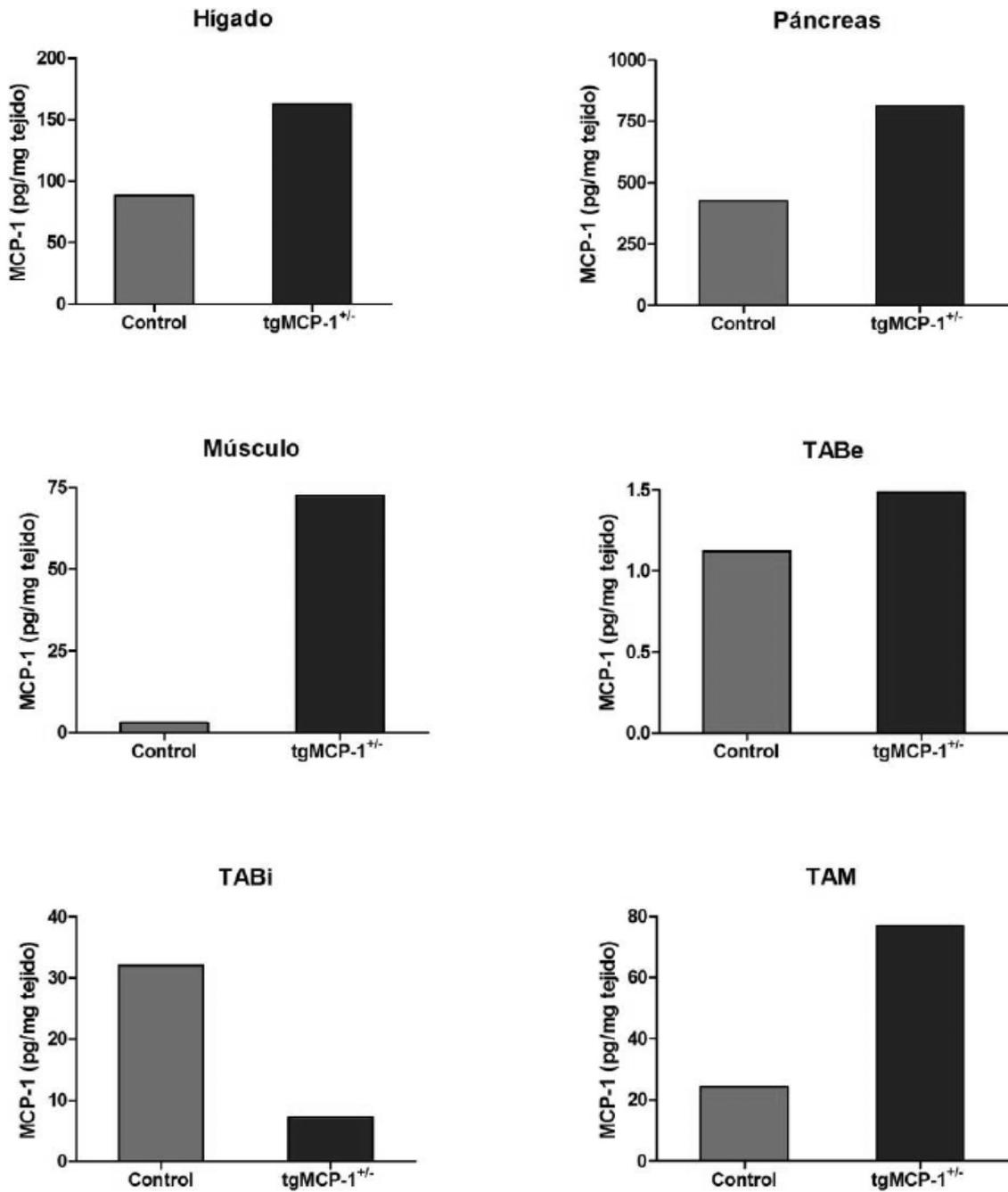


Figura 2B

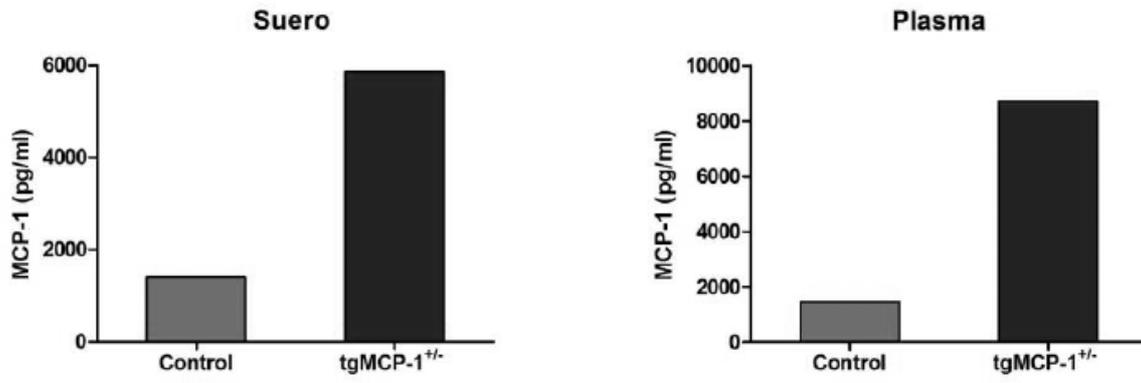


Figura 3

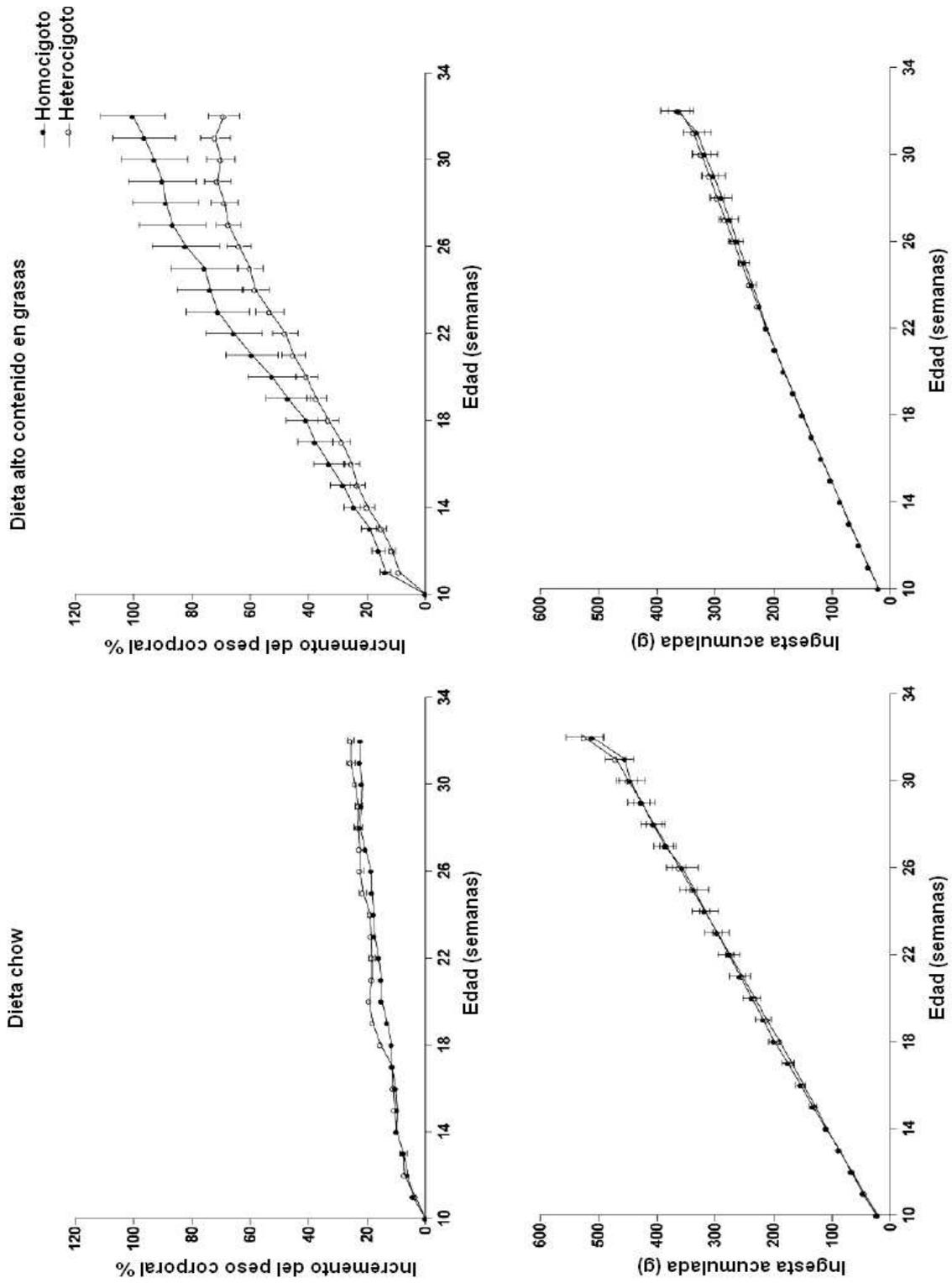


Figura 4

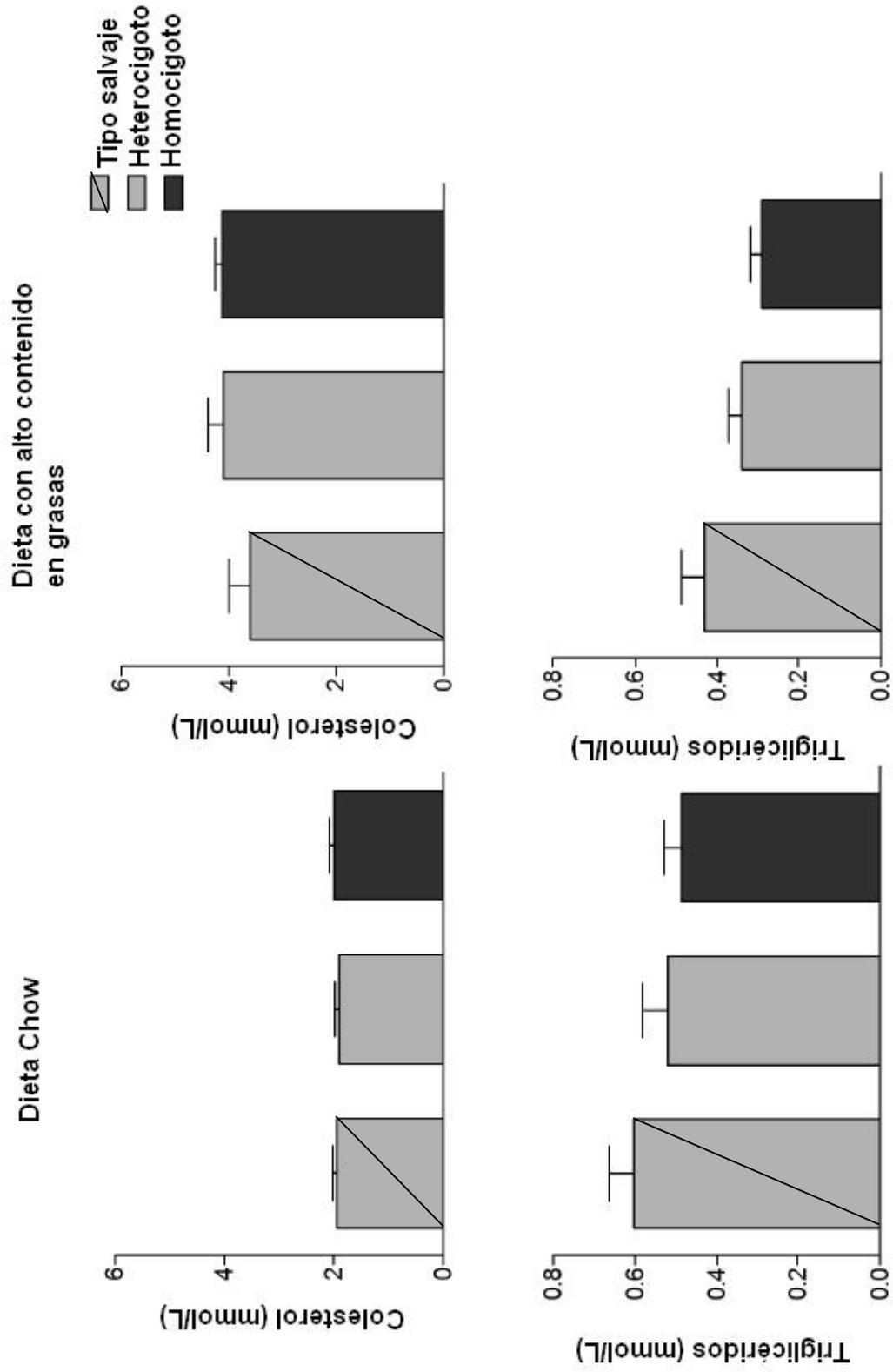


Figura 5

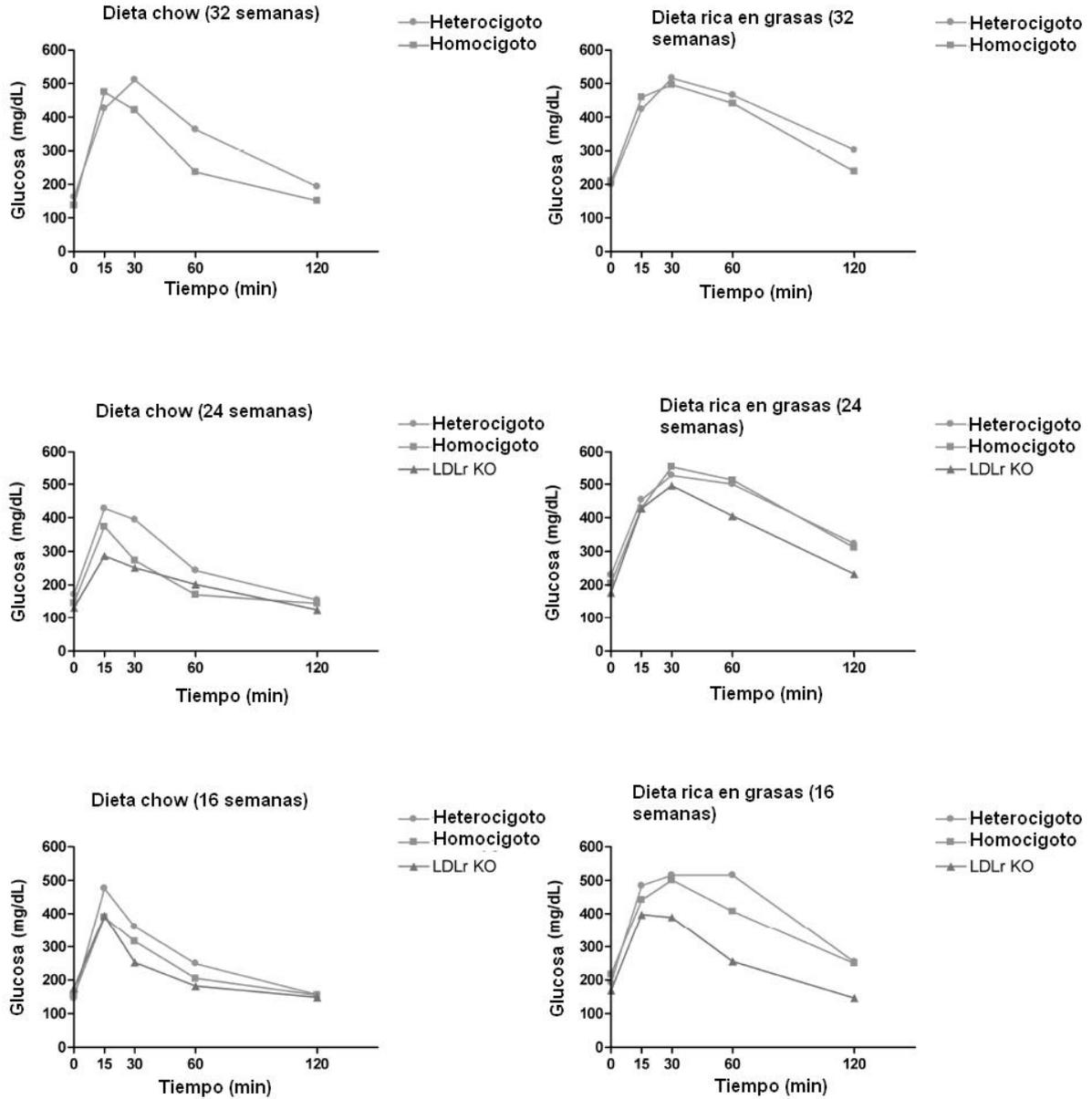


Figura 6

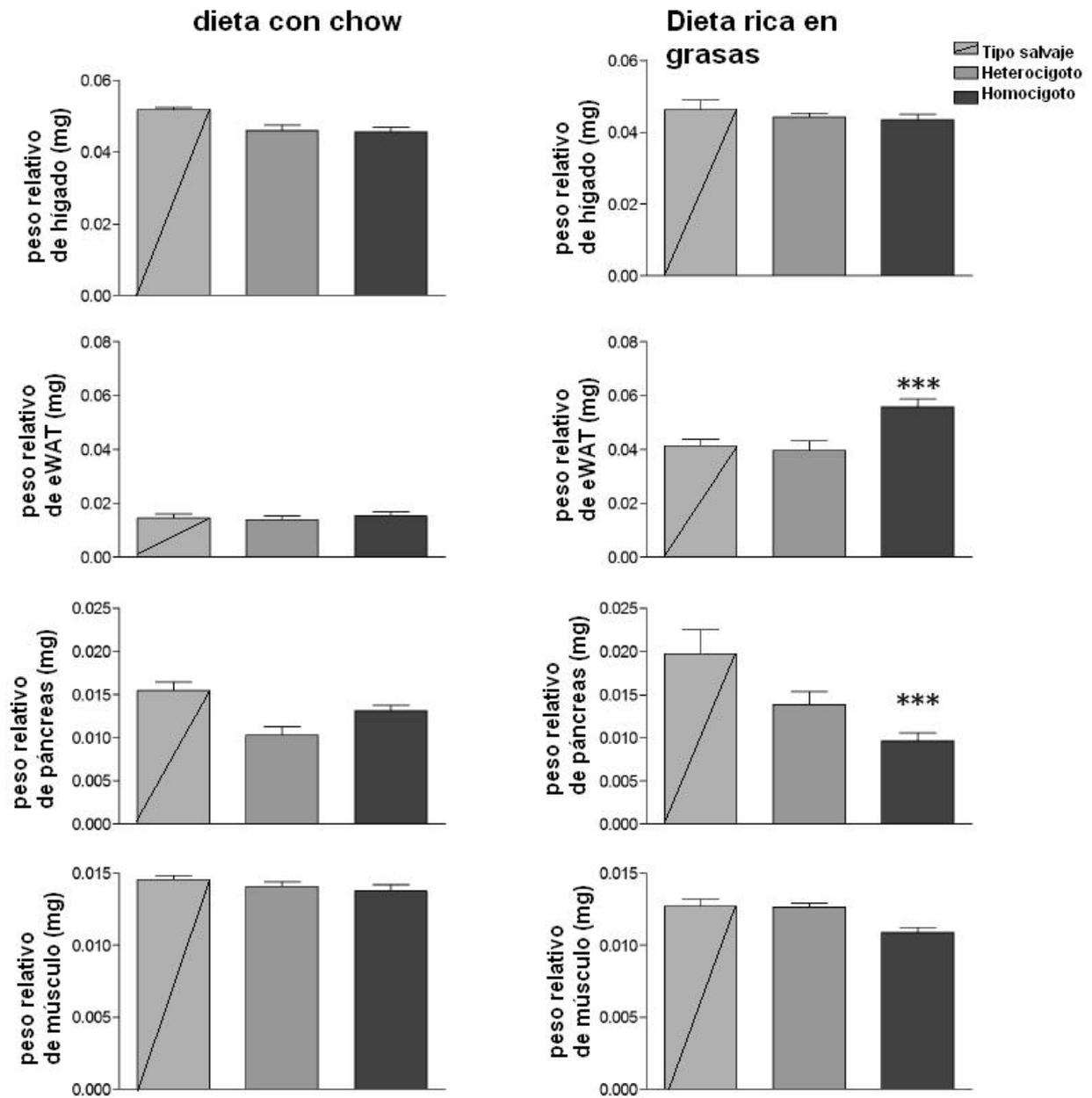


Figura 6 (continuación)

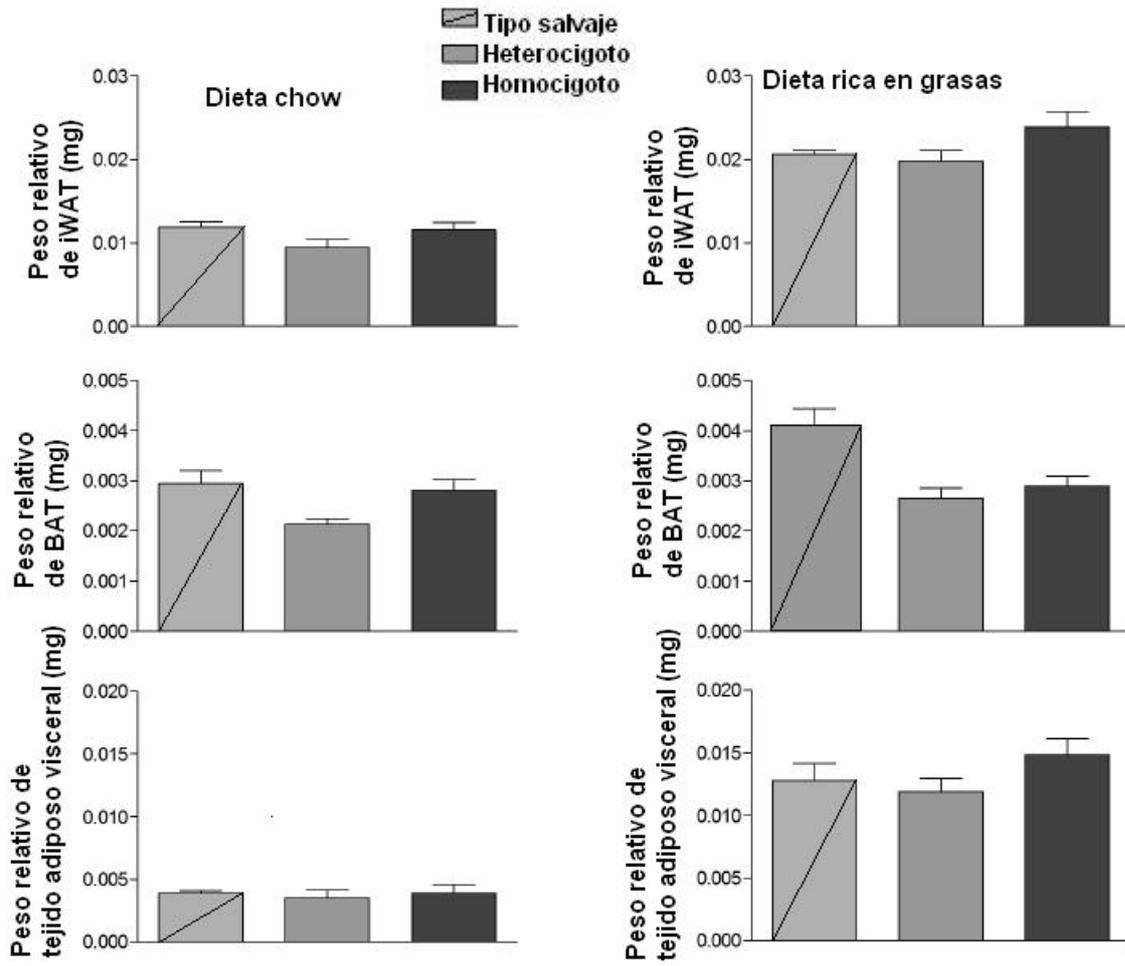


Figura 7

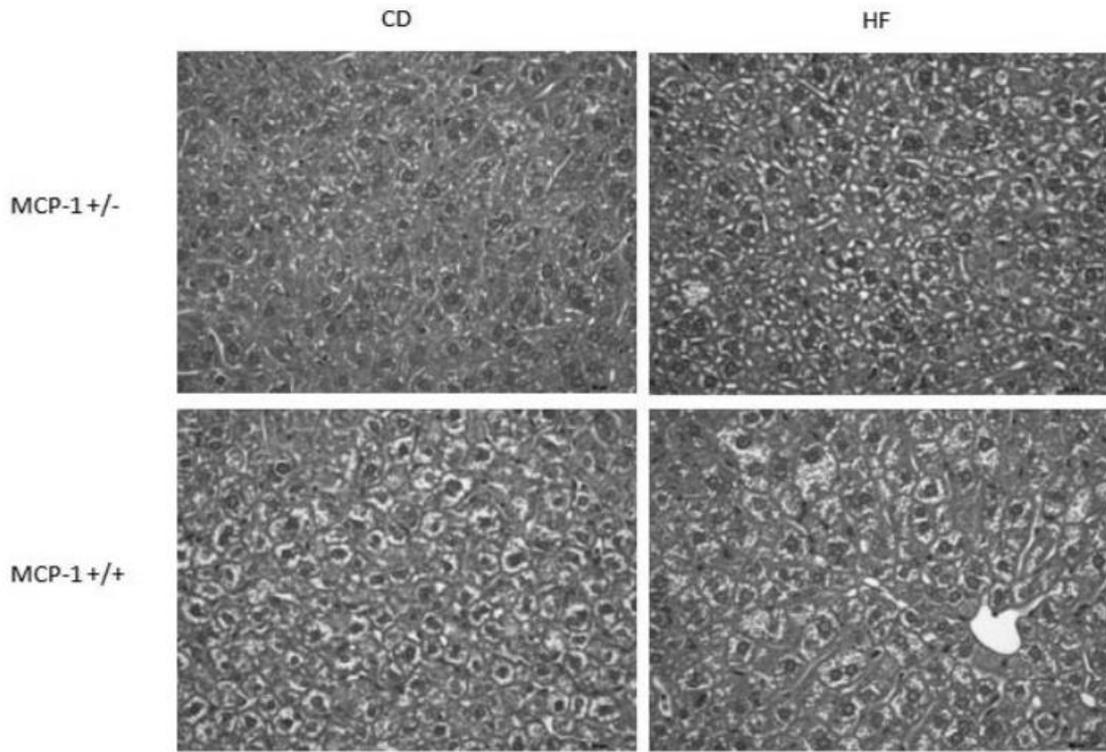


Figura 8

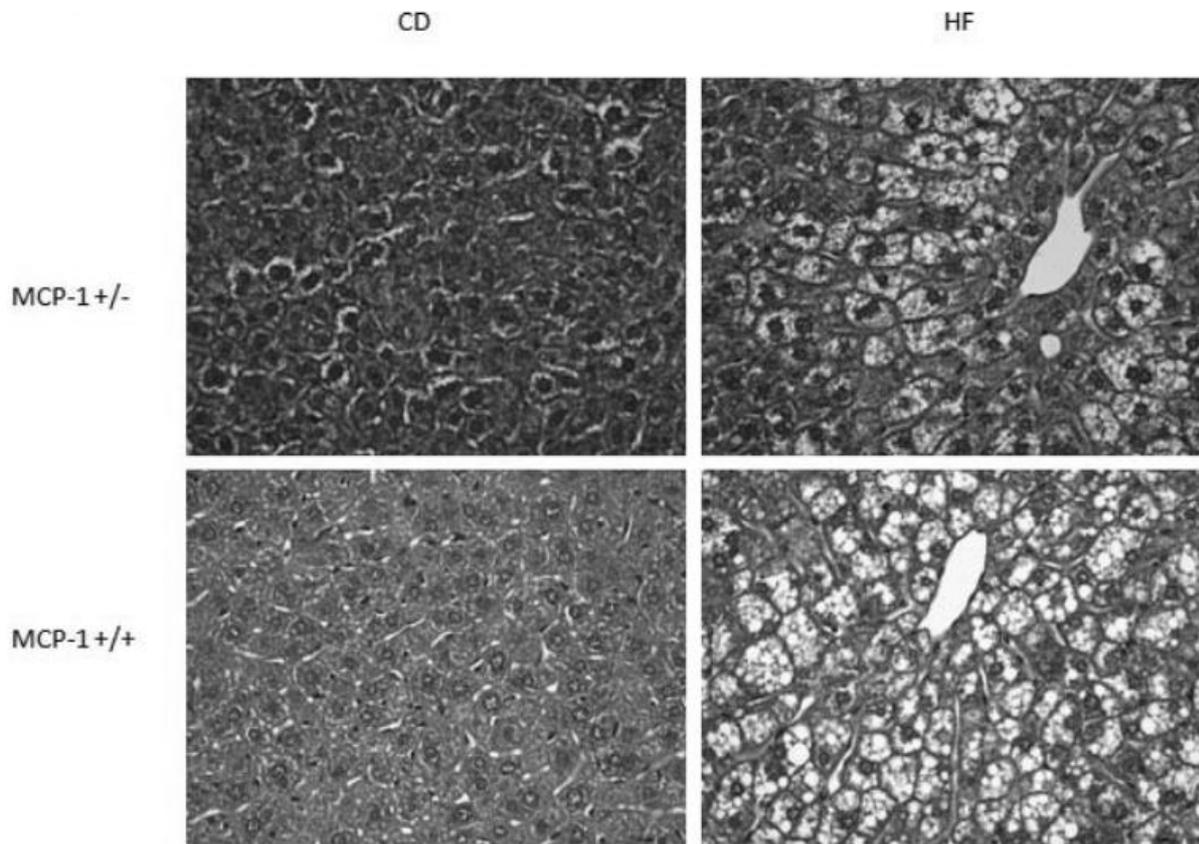


Figura 9

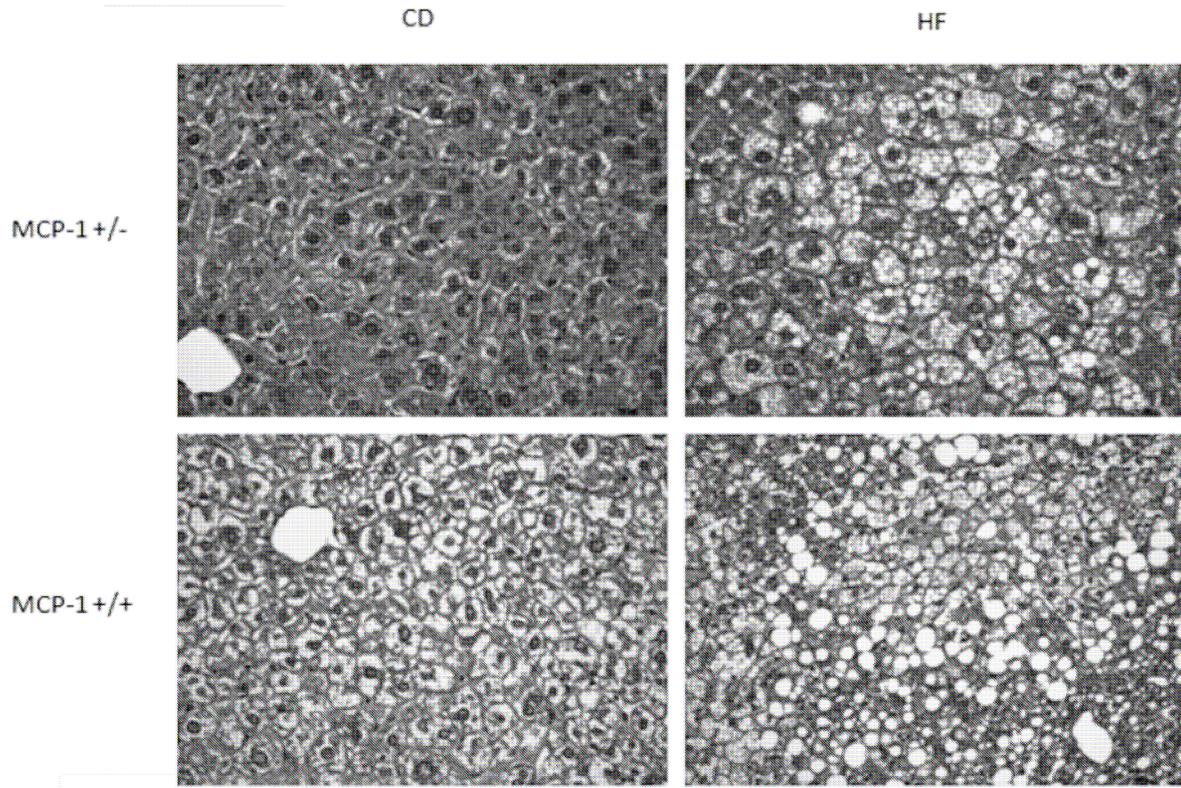


Figura 10

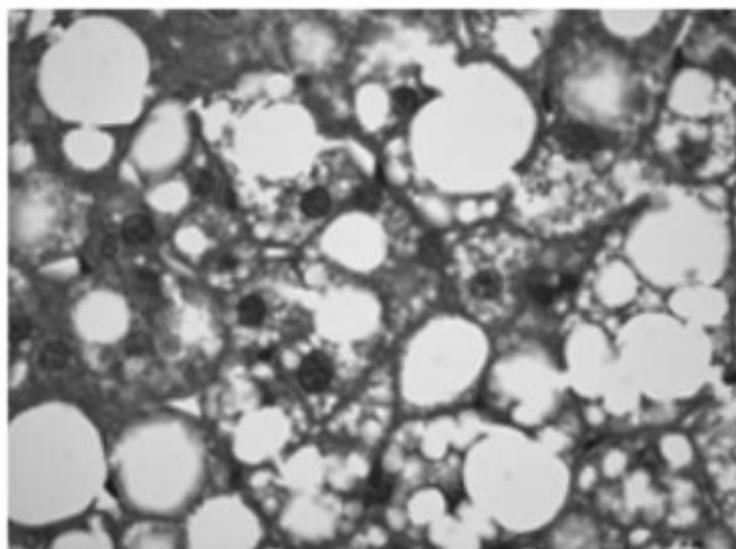
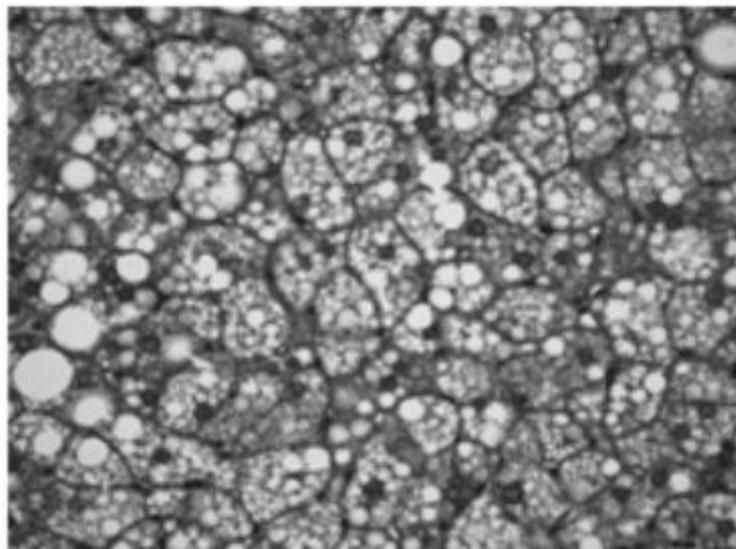
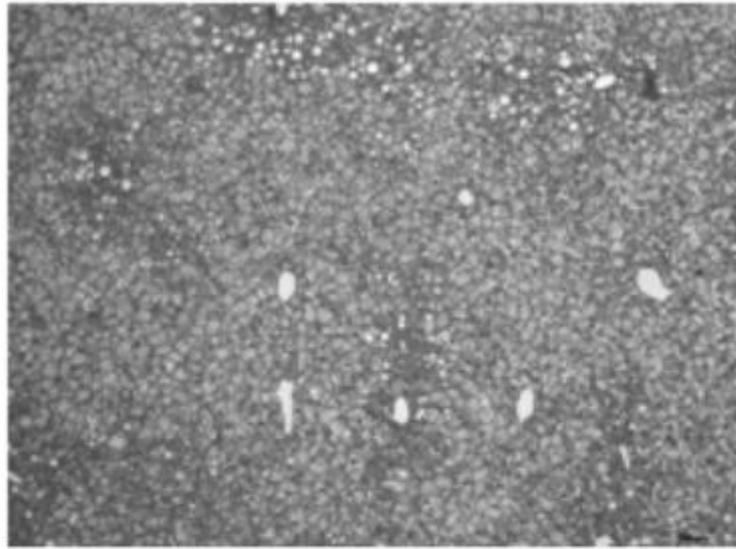


Figura 11

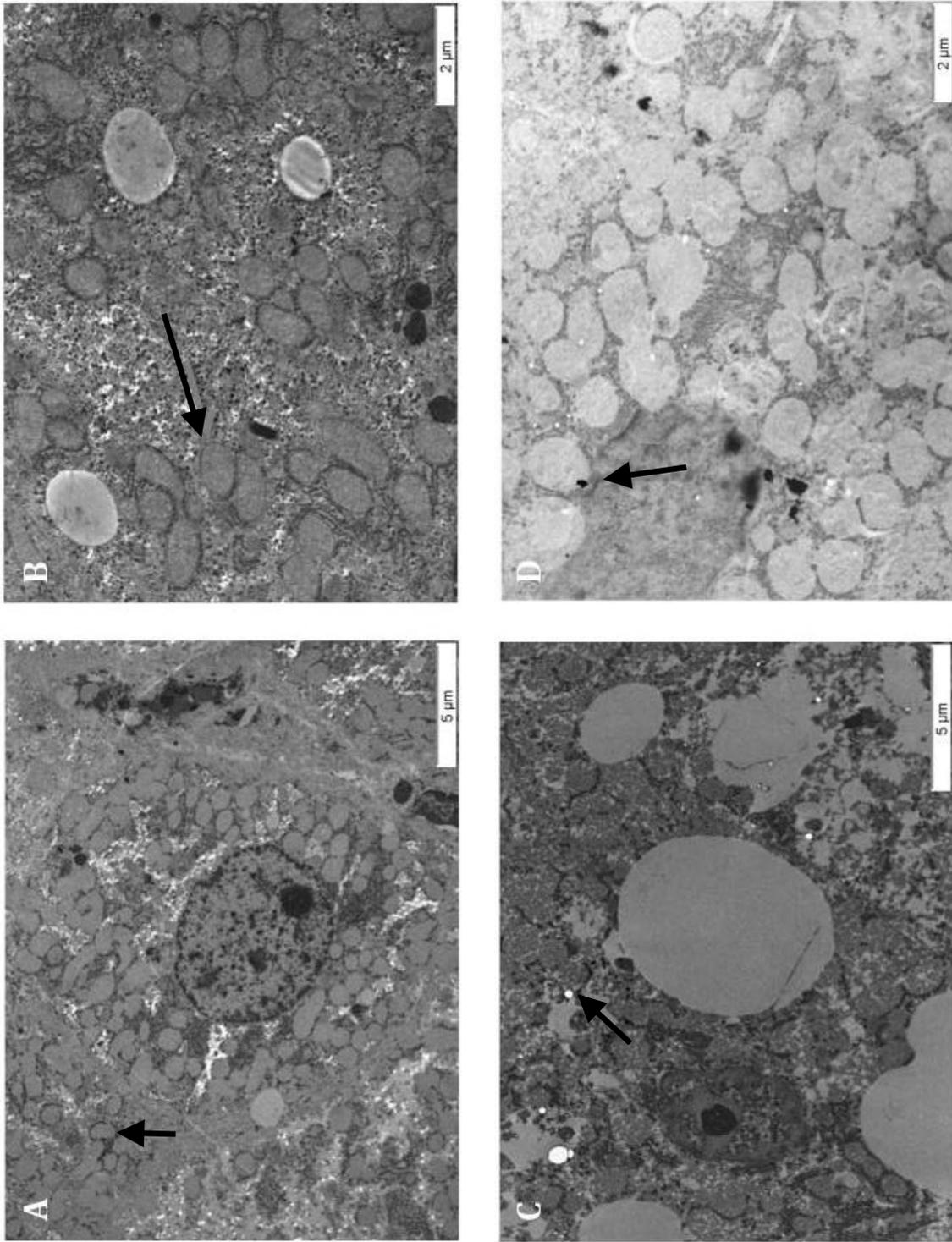
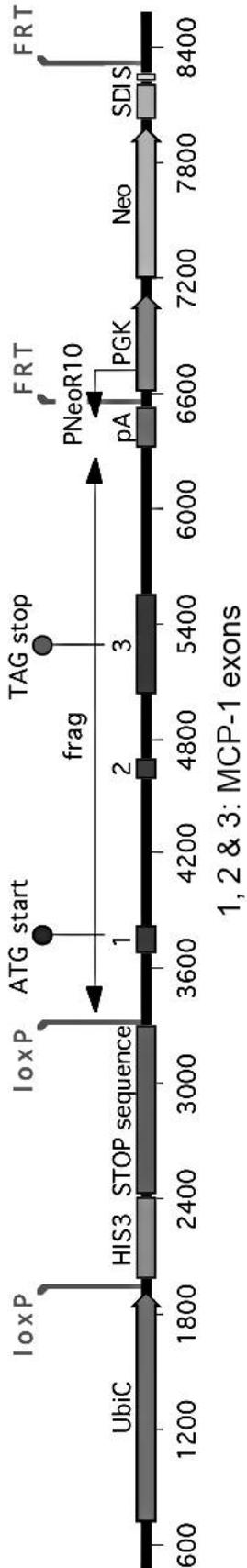


Figura 12





- ②① N.º solicitud: 201330418
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.03.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K67/027** (2006.01)
C07K14/52 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | KAMEI NOZOMU et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. The Journal of biological chemistry United States 8 Sep 2006 08.09.2006 VOL: 281 No: 36 Págs: 26602-26614, todo el documento. | 1-9 |
| X | RULL A. et al., "Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism", Mediators of Inflammation (2010), Volumen 2010, Article ID 326580, 11 páginas doi:10.1155/2010/326580, todo el documento. | 1-9 |
| X | US 5817911 A (WILLIAMS LEWIS T et al.) 06.10.1998, todo el documento. | 1-3 |
| A | Citado en la solicitud. | 4-9 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.02.2014

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

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

A01K, C07K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2014

Declaración

| | | |
|---|----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-9 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-9 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | KAMEI NOZOMU et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance..The Journal of biological chemistry United States 8 Sep 2006 08.09.2006 VOL: 281 No: 36 Págs: 26602-26614, todo el documento. | 08.09.2006 |
| D02 | RULL A. et al., "Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity:Role ofMonocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism", Mediators of Inflammation (2010),Volumen 2010, Article ID 326580, 11 páginas doi:10.1155/2010/326580, todo el documento. | |
| D03 | US 5817911 A (WILLIAMS LEWIS T et al.) | 06.10.1998 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a una cepa de ratones con doble dotación génica de MCP-1(tgMCP-1), cisgénica y homocigota, sobre productores de MCP-1, presente tanto en células somáticas como germinales, útiles en el estudio de enfermedades como por ejemplo, la obesidad, la esteatosis hepática o la aterosclerosis.

El documento D01describe la obtención de ratones transgénicos que sobre expresan MCP-1 en el tejido adiposo. El gen mcp-1 está controlado por el promotor aP2. La sobreexpresión de MCP-1 causa la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo y provoca resistencia a la insulina. La obesidad no solo está íntimamente relacionada con la resistencia a insulina sino que también está asociada con el incremento de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo que secretan moléculas inflamatorias y causan diversos desordenes inflamatorios.

El documento D02 consiste en una revisión sobre el papel de MCP-1 en la regulación del metabolismo y su relación con la resistencia a la insulina, la obesidad, los procesos inflamatorios y desordenes metabólicos asociados.

El documento D03 describe la obtención de un ratón transgénico que sobre expresa MCP-1 humano en células epiteliales pulmonares.

1.- NOVEDAD

Los ratones descritos en los documentos citados en el informe de búsqueda no son exactamente iguales a los de la presente invención. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-9 son nuevas y cumplen el requisito del Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA.

D01 se considera el estado de la técnica más próximo a la invención. El documento D01describe la obtención de ratones transgénicos heterocigotos que sobre expresan MCP-1 en el tejido adiposo. El gen mcp-1 procede de ratón y está controlado por el promotor aP2. En este sentido, el problema técnico subyacente se puede plantear como la provisión de un nuevo ratón transgénico sobre productor de MCP-1. La solución propuesta en la invención consiste en El ratón de la invención difiere con el ratón descrito en D01 en que es un ratón con doble dotación génica de MCP-1(tgMCP-1), cisgénica y homocigota y se expresa en todos los tejidos. La tecnología de obtención de ratones transgénicos permitiría a un experto en la materia obtener el ratón de la invención aplicando de forma rutinaria las técnicas habituales. En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1-3 carece de la actividad inventiva establecida en el Art. 8.1 LP 11/1986.

Por otra parte, a la vista de la relación que se establece en D01 entre la sobreproducción de MCP-1 y la resistencia a insulina y la obesidad, las diversas utilidades de las cepas de la invención resultarían obvias para un experto en la materia. En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 4-9 carece de la actividad inventiva establecida en el Art. 8.1 LP 11/1986.