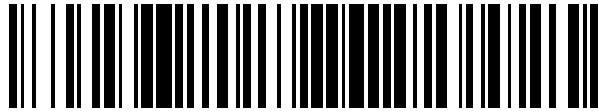


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 535**

51 Int. Cl.:

G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2012 E 13169122 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2631654**

54 Título: **Ensayo de liberación de neuropéptido para canales de sodio**

30 Prioridad:

12.05.2011 US 201161485488 P

08.06.2011 US 201113155491

19.09.2011 US 201113236117

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.07.2015

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

ALESSANDRI HABER, NICOLE M.;

MACDONALD, LYNN;

LACROIX-FRALISH, MICHAEL L. y

MURPHY, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 541 535 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

Ensayo de liberación de neuropéptido para canales de sodio

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 61/485.488, presentada el 12 de mayo de 2011, la solicitud de Estados Unidos Nº de serie 13/155.491, presentada el 08 de junio de 2011, y la solicitud de Estados Unidos Nº de serie 13/236.117 presentada el 19 septiembre de 2011; cada solicitud se incorpora específicamente en este documento por referencia en su totalidad.

10 **Campo de la invención**

Se proporcionan animales no humanos genéticamente modificados que expresan canales humanos de sodio abiertos por voltaje (Na_v) o fragmentos de los mismos, en particular $\text{Na}_v1.7$ (*Scn9A*). Se proporcionan ratones modificados genéticamente útiles para la identificación y ensayo de antagonistas para el tratamiento de patologías o trastornos de dolor crónico asociados con actividad y/o función aberrante de $\text{Na}_v1.7$. Se proporcionan métodos para preparar animales no humanos modificados genéticamente que expresan proteína $\text{Na}_v1.7$ humana y, como alternativa, que expresan una proteína $\text{Na}_v1.7$ parcialmente humana. Se proporcionan animales no humanos que no expresan una proteína $\text{Na}_v1.7$ endógena.

20 **Antecedentes**

Los canales de sodio son proteínas integrales de membrana que forman canales de iones en la membrana plasmática de células excitables. Se clasifican como canales de sodio abiertos por voltaje (Na_v), que permiten el flujo de entrada de iones Na^+ que median los potenciales de acción en células excitables; y canales de sodio abiertos por ligando, que se unen a ligando que desencadena el flujo de entrada de iones que conduce a potenciales de acción similares.

Los canales Na_v , como los canales de calcio y potasio, están compuestos por una subunidad- α muy grande y compleja en la superficie de la célula que incluye cuatro dominios (DI-DIV), cada uno con seis segmentos de hélice- α transmembrana (S1-S6) e incluyendo un poro que permite el flujo de entrada de iones Na^+ a la célula (FIG. 1; véase también Clare 2010 Expert Opin. Investig. Drugs 19(1): 45-62). Para canales Na_v , un único gen codifica todos estos dominios. El segmento transmembrana 4 (S4) dentro de cada dominio de los canales Na_v contiene aminoácidos cargados positivamente (FIG. 1) que actúan como sensor de voltaje. El bucle intracelular que conecta los dominios III y IV contiene secuencias que están aparentemente implicadas en la inactivación. Los canales Na_v interactúan con otras proteínas sobre la superficie celular llamadas subunidades- β , que están implicadas en la cinética del canal y las funciones de apertura dependiente de voltaje. Los canales Na_v muestran aparentemente diversas propiedades funcionales y distintos patrones de expresión, que implican funciones especializadas entre los canales y predispone a algunos para tareas en la transmisión de señales específicas, por ejemplo, señales de dolor.

40 A pesar de los muchos esfuerzos por dilucidar las propiedades y funciones de canales Na_v humanos, el gran tamaño y naturaleza compleja de su estructura hace difícil estudiar los aspectos globales de su actividad biológica y su implicación en la respuesta del dolor. Esta dificultad está aumentada por el hecho de que la delección global es letal; crías *Scn9A*^{-/-} mueren poco después de nacer, aparentemente debido a un fallo en la alimentación. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos que suplementen y potencien los actuales sistemas *in vitro* (por ejemplo, células transfectadas *in vitro* que contienen construcciones que expresan canales Na_v humanos en cultivo) empleando enfoques más sensibles biológicamente para preparar animales no humanos y células que incluyan canales Na_v humanos completos o canales Na_v quiméricos que contengan fragmentos humanos específicos asociados con la activación del canal Na_v y que puedan funcionar facilitando la respuesta del dolor.

50 **Sumario de la invención**

Se proporcionan animales no humanos, tejidos, y células modificadas por ingeniería genética que expresan una subunidad- α de Na_v humano, o un fragmento funcional de la misma, sobre la superficie de una célula. En diversas realizaciones, la subunidad- α de Na_v es una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$.

55 En un aspecto, se proporcionan animales no humanos modificados por ingeniería genérica que expresan una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ sobre la superficie de una célula proporcionando un sistema *in vivo* para identificar antagonistas del canal, y para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos o síndromes de dolor, tales como, por ejemplo, dolor crónico, eritromelalgia (IEM) y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

60 En un aspecto, se proporcionan animales no humanos modificados por ingeniería genética que expresan una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ sobre la superficie de una célula y proporcionan un sistema para ensayar de forma selectiva la eficacia y toxicidad de un agente terapéutico sobre formas mutantes o variantes de $\text{Na}_v1.7$ humano. En una realización, el agente terapéutico es un compuesto que funciona como bloqueante de canales de sodio. En una realización específica, el compuesto es un compuesto sintético. En una realización, el compuesto sintético se

selecciona entre lidocaína, mexiletina, carbamazepina, amitriptilina y bifenil pirazoles, o una combinación de los mismos. En otra realización, el compuesto es una toxina. En una realización específica, la toxina se selecciona entre tetrodotoxina y neosaxitoxina o una combinación de las mismas.

5 En una realización, se proporcionan animales no humanos modificados por ingeniería genética que expresan una subunidad- α de $Na_v1.7$ sobre la superficie de una célula y proporcionan un sistema para ensayar de forma selectiva la funcionalidad (por ejemplo, eficacia) y/o toxicidad de combinaciones de agentes terapéuticos sobre formas mutantes o variantes de un $Na_v1.7$ humano. En una realización, la combinación de agentes terapéuticos comprende proporcionar un efecto sinérgico tras la administración al animal no humano modificado por ingeniería genética. En
10 una realización específica, la combinación de agentes terapéuticos comprende al menos dos de un compuesto sintético, una toxina de origen natural, o una proteína (por ejemplo, un anticuerpo anti- Na_v).

En un aspecto, se proporcionan ratones modificados por ingeniería genética que expresan una proteína de canal Na_v humano, específicamente una subunidad- α de $Na_v1.7$ humano. Los ratones se modifican por ingeniería genética para incluir todo o sustancialmente todo el gen de $Na_v1.7$ humano.
15

En una realización, el gen de $Na_v1.7$ humano reemplaza un gen de $Na_v1.7$ de ratón endógeno en el locus endógeno de $Na_v1.7$ de ratón.

20 En un aspecto, se proporcionan ratones modificados por ingeniería genética que expresan una subunidad- α de $Na_v1.7$ quimérica, donde el ratón incluye una subunidad- α de $Na_v1.7$ de ratón modificada con uno o más bucles de poro extracelular que contienen una secuencia correspondiente de un gen de $Na_v1.7$ humano.

En una realización, la subunidad- α de $Na_v1.7$ quimérica comprende un bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I que comprende la secuencia correspondiente del gen de $Na_v1.7$ humano. En otra realización, la subunidad- α de $Na_v1.7$ quimérica comprende un bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III que comprende la secuencia correspondiente del gen de $Na_v1.7$ humano.
25

30 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que comprende sustancialmente todo el ADN genómico humano que codifica una proteína $Na_v1.7$. En otro aspecto, el ratón modificado genéticamente comprende una parte de ADN genómico humano, y el ratón expresa una proteína $Na_v1.7$ quimérica.

En una realización, la parte de ADN genómico humano comprende una secuencia humana que codifica el bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I del gen de $Na_v1.7$ humano. En otra realización, la parte de ADN genómico humano comprende una secuencia humana que codifica el bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III del gen de $Na_v1.7$ humano.
35

40 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que es capaz de expresar una proteína $Na_v1.7$ humana o quimérica sobre la superficie de una célula del ratón.

En una realización, el $Na_v1.7$ es quimérico y comprende un bucle de poro extracelular humano. En una realización específica, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En otra realización específica, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.
45

En una realización, la célula es una célula excitable. En otra realización, la célula es una célula no excitable. En una realización específica, la célula es una neurona. En una realización específica, la célula es una neurona del ganglio de la raíz dorsal (DRG). En otra realización específica, la célula es una neurona del ganglio simpático.
50

En una realización, el gen de $Na_v1.7$ humano o quimérico está unido de forma funcional a una secuencia líder humana o de ratón. En una realización, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón.

55 En una realización, el gen de $Na_v1.7$ humano o quimérico está unido de forma funcional a un promotor humano o de ratón. En una realización específica, el promotor es un promotor endógeno del gen de $Na_v1.7$ de ratón.

En una realización, el ratón modificado genéticamente comprende un locus del gen de $Na_v1.7$ humano que codifica una proteína $Na_v1.7$ humana. En otra realización, el ratón modificado genéticamente comprende un locus del gen de $Na_v1.7$ quimérico que comprende una secuencia humana que codifica un bucle de poro extracelular que es sustancialmente humano. En una realización específica, la secuencia humana codifica un bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I de la proteína $Na_v1.7$ quimérica. En otra realización específica, la secuencia humana codifica un bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III de la proteína $Na_v1.7$ quimérica.
60

65 En una realización, el locus del gen de $Na_v1.7$ comprende un fragmento genómico humano que comprende

aproximadamente 113 kb de ADN que codifica una proteína Na_v1.7 humana. En una realización específica, el locus del gen de Na_v1.7 comprende los exones 2 a 28 de un gen de Na_v1.7 humano.

5 En otra realización, el locus del gen de Na_v1.7 comprende una secuencia de ácido nucleico de un locus del gen de Na_v1.7 humano que comprende aproximadamente 10 kb de ADN que codifica un bucle de poro extracelular de una proteína Na_v1.7 humana. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico comprende los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano. En una realización específica, el bucle de poro extracelular es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I de una proteína Na_v1.7 humana.

10 En otra realización, el locus del gen de Na_v1.7 comprende una secuencia de ácido nucleico genómica humana que comprende aproximadamente 2,8 kb de ADN que codifica un bucle de poro extracelular de una proteína Na_v1.7 humana. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico genómica humana comprende los exones 23 a 25 de un gen de Na_v1.7 humano. En una realización específica, el bucle de poro extracelular es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III de una proteína Na_v1.7 humana.

15 En una realización, el ratón modificado genéticamente es capaz de expresar una proteína Na_v1.7 completamente humana. En otra realización, el ratón modificado genéticamente es capaz de expresar una proteína Na_v1.7 parcialmente humana. En una realización específica, el ratón modificado genéticamente es capaz de expresar una proteína Na_v1.7 quimérica que comprende una secuencia extracelular de una proteína Na_v1.7 humana.

20 En una realización, la proteína Na_v1.7 parcialmente humana comprende un bucle de poro extracelular que contiene una secuencia humana. En una realización específica, el bucle de poro extracelular se selecciona entre el grupo que consiste en el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I, y el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III. En una realización específica, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En otra realización, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.

25 En una realización, el ratón comprende una célula que expresa una proteína Na_v1.7 humana. En otra realización, el ratón comprende una célula que expresa una proteína Na_v1.7 quimérica que comprende uno o más bucles de poro extracelular humano. En una realización específica, los bucles de poro extracelular humanos se seleccionan entre el grupo que consiste en el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III, y una combinación de los mismos. En una realización específica, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En otra realización, el bucle de poro extracelular humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III. En una realización, la célula es una célula excitable. En otra realización, la célula es una célula no excitable. En una realización específica, la célula es una neurona. En una realización específica, la neurona es una neurona DRG. En otra realización específica, la neurona es una neurona del ganglio simpático.

30 En una realización, el ratón comprende una combinación de una o más realizaciones y/o aspectos descritos en esta descripción.

35 En una realización, el ratón modificado genéticamente es una cepa C57BL, y en una realización específica seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola. En una realización específica, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 mencionada anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac).

40 En un aspecto, se proporciona una célula de ratón que se aísla de un ratón como se describe en este documento. En una realización, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es una célula excitable. En otra realización, la célula es una célula no excitable. En una realización, la célula es una neurona. En una realización específica, la neurona es una neurona DRG. En otra realización específica, la neurona es una neurona del ganglio simpático.

45 En otro aspecto, se proporciona una célula; donde la célula alberga una proteína Na_v1.7 que comprende una secuencia humana correspondiente a un bucle de poro extracelular de la proteína del canal Na_v1.7.

50 En una realización, la célula es una célula neuronal. En una realización específica, la célula se selecciona entre una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG), una célula del ganglio trigémino y una neurona del ganglio simpático. En una realización específica, la célula es una célula DRG que expresa una proteína Na_v1.7 que comprende un bucle humano seleccionado entre el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de los mismos. En una realización, el bucle humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del

dominio I. En una realización, el bucle humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.

En una realización, la célula está inmortalizada.

5 En un aspecto, se proporciona un embrión de ratón, donde el embrión comprende una célula ES donante que se obtiene de un ratón como se describe en este documento.

10 En un aspecto, se proporciona un vector de direccionamiento, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómico humano que contiene un gen de Na_v1.7 humano un fragmento del mismo y un casete de selección. En un aspecto, se proporciona un vector de direccionamiento que comprende una secuencia de ácido nucleico genómico humano de ~113 kb que comprende los exones 2 a 28 de un gen de Na_v1.7 humano y un casete de higromicina. En otro aspecto, se proporciona un vector de direccionamiento, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómico humano de ~10 kb que comprende los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano y un casete de neomicina. En otro aspecto, se proporciona un vector de direccionamiento, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómico humano de ~2,8 kb que comprende los exones 23 a 25 de un gen de Na_v1.7 humano y un casete de neomicina.

20 En un aspecto, se proporciona una proteína Na_v1.7 fabricada por un ratón como se describe en este documento, donde la proteína Na_v1.7 comprende una secuencia humana codificada por un fragmento de un gen de Na_v1.7 humano seleccionado entre el grupo que consiste en los exones 2 a 28, exones 7 a 9, y exones 23 a 25 de un gen de Na_v1.7 humano. En un aspecto, el fragmento del gen de Na_v1.7 humano es los exones 2 a 28. En otro aspecto, el fragmento del gen de Na_v1.7 humano es los exones 7 a 9. En otro aspecto, el fragmento humano del gen de Na_v1.7 humano es los exones 23 a 25.

25 En una realización, la proteína Na_v1.7 se reconstituye en una vesícula. En una realización, el Na_v1.7 está presente en una preparación de vesícula de un ratón como se describe en este documento.

30 En un aspecto, se proporciona un método para crear un ratón que exprese una proteína Na_v1.7 completa o parcialmente humanizada en una superficie de una célula excitable, que comprende (a) modificar genéticamente una célula ES de ratón reemplazando una o más secuencias de ADN de ratón de Na_v1.7 con una o más secuencias de ADN de Na_v1.7 humano para formar una célula ES donante de ratón; (b) introducir la célula ES donante de ratón en un embrión de ratón hospedador para formar un embrión modificado; (c) gestar el embrión modificado en un ratón adecuado; y (d) obtener una cría de ratón que exprese la proteína Na_v1.7 completa o parcialmente humanizada sobre la superficie de una célula excitable de la cría de ratón.

35 En una realización, la una o más secuencias de ADN de Na_v1.7 humano se seleccionan entre los exones 2 a 28 de un gen de Na_v1.7 humano, los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano y los exones 23 a 25 de un gen de Na_v1.7 humano.

40 En una realización, la una o más secuencias de ADN de Na_v1.7 humano es toda o sustancialmente toda una secuencia de ADN de Na_v1.7 humano. En una realización específica, la secuencia es los exones 2 a 28 de un gen de Na_v1.7 humano. En otra realización específica, la secuencia es los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano. En otra realización específica, la secuencia es los exones 23 a 25 de un de Na_v1.7 humano.

45 En un aspecto, se proporciona un ratón que expresa una subunidad- α de Na_v1.7 humano a partir de un locus de Na_v1.7 de ratón endógeno, donde el ratón expresa una subunidad- β de Na_v de ratón endógena, y donde el ratón expresa una proteína Na_v endógena seleccionada entre el grupo que consiste en Na_v1.6, Na_v1.8, y Na_v1.9.

50 En una realización, la subunidad- α de Na_v1.7 humano es una subunidad- α de Na_v1.7 variante, donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G, F1449V, o una combinación de las mismas.

55 En una realización, la subunidad- α de Na_v1.7 humano es una subunidad- α de Na_v1.7 variante, donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K, A1632E, o una combinación de las mismas.

60 En una realización, la subunidad- α de Na_v1.7 humano es una subunidad- α de Na_v1.7 variante, donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende F1200L, I1235L, o una combinación de las mismas.

65 En una realización, la subunidad- α de Na_v1.7 humano es una subunidad- α de Na_v1.7 truncada, donde la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 truncada finaliza en un resto de aminoácido seleccionado entre 259, 277, 328, 459, 693, 767, 830, 897, 1488, 1659 y 1689. En una realización específica, la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 truncada finaliza en el resto de aminoácido 693. En otra realización específica, la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 truncada finaliza en el resto de aminoácido 1488.

5 En un aspecto, se proporciona un método para preparar una línea celular a partir de una célula que expresa una secuencia de Na_v1.7 humano, que comprende obtener una célula que expresa una secuencia de Na_v1.7 humano de un ratón como se describe en este documento, aislar y clonar la célula, y mantener la célula aislada y clonada en cultivo. En una realización, el método comprende adicionalmente inmortalizar la célula. En una realización, la célula es una célula neuronal, por ejemplo, una neurona del ganglio de la raíz dorsal (DRG).

10 En un aspecto, se proporciona un método para preparar una línea celular inmortalizada a partir de una célula aislada de un ratón como se describe en este documento, que comprende proporcionar una célula aislada que expresa un canal Na_v1.7 humano, quimérico o humano variante, transfectar la célula aislada con un vector que codifica un oncogén y un marcador de selección (por ejemplo, neomicina), cultivar las células en cultivo bajo selección para permitir la expansión de células que se han transfectado con el vector retroviral, seleccionar una célula transfectada del cultivo que contiene el vector, aislar las células que contienen el vector por tratamiento con tripsina y dilución limitante de la célula transfectada en cultivo, y crear una línea celular clonal a partir del clon aislado que ha sobrevivido a la selección por pase en un nuevo cultivo.

15 En una realización, la célula aislada es una neurona. En una realización, la célula aislada es una neurona DRG.

20 En una realización, el canal Na_v1.7 humano está codificado por los exones 2-28 de un gen de Na_v1.7 humano. En otra realización, el canal Na_v1.7 quimérico está codificado por una secuencia genómica que comprende una secuencia de un gen de Na_v1.7 humano que codifica una secuencia extracelular de un gen de Na_v1.7 humano.

25 En una realización, la secuencia extracelular codifica una secuencia de bucle de poro. En una realización específica, la secuencia de bucle de poro se selecciona entre un bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I y un bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III. En una realización específica, el bucle de poro es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En otra realización, el bucle de poro es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.

30 En un aspecto, se proporciona un método para identificar un antagonista de una proteína Na_v1.7 humana, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a un antagonista sospechoso de Na_v1.7 humano, y determinar un efecto del antagonista sobre la función de Na_v1.7 en el ratón.

35 En una realización, la determinación del efecto del antagonista comprende medir la presencia o ausencia de una acción potencial tras estimulación de una célula que comprende el Na_v1.7 humano.

En una realización, el antagonista es específico para Na_v1.7 y no muestra actividad antagonista con respecto a Na_v1.6, Na_v1.8, y Na_v1.9.

40 En un aspecto, se proporciona un método para determinar la actividad de unión de un agente terapéutico que se une a una secuencia de Na_v1.7 humano, que comprende poner en contacto el agente terapéutico con una célula que expresa una secuencia de Na_v1.7 humano, y determinar si el agente terapéutico se une a la secuencia de Na_v1.7 humano. En una realización, la célula se obtiene de un ratón como se describe en este documento.

45 En una realización, la célula es una célula neuronal. En una realización específica, la célula se selecciona entre una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG), una célula del ganglio trigémino y una neurona del ganglio simpático. En una realización específica, la célula es una célula DRG que expresa una proteína Na_v1.7 que comprende un bucle humano seleccionado entre el grupo que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de los mismos. En una realización, el bucle humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En una realización, el bucle humano es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.

55 En una realización, la célula está inmortalizada.

En una realización, el agente terapéutico se une a un Na_v1.7 humano pero no se une a una secuencia de Na_v1.7 seleccionada entre una de ratón, de rata, de mono, y una combinación de las mismas.

60 En una realización, el agente terapéutico que se une a la secuencia de Na_v1.7 humano se selecciona entre una benzodiazepina, una benzazepinona, una tetrodotoxina, una dicarboxamida de bifenil pirazol, un bloqueante de canales de sodio (por ejemplo, amitriptilina, mexiletina, lidocaína, carbamazepina, bifenil pirazoles), un antagonista tipo-T de piperidina (por ejemplo, Z123212), y análogos de los mismos.

65 En una realización, el agente terapéutico que se une a la secuencia de Na_v1.7 humano se selecciona entre una proteína de unión que comprende una V_H y/o V_L de inmunoglobulina o fragmento de unión a Na_v1.7 de la misma, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, una inmunoadhesina, un ligandocuerpo, pepticuerpo, y un anticuerpo de

dominio (por ejemplo, dAb). En una realización específica, el agente terapéutico comprende una inmunoglobulina humana o región variable de receptor de células T. En una realización específica, el agente terapéutico es un anticuerpo humano.

5 En un aspecto, se proporciona un sistema *in vitro* para identificar un antagonista de una proteína Na_v1.7 humana, que comprende aislar un componente que contiene Na_v1.7 de un ratón como se describe en este documento, exponer el componente a un antagonista sospechoso de Na_v1.7 humano, y determinar un efecto del antagonista sobre la función de Na_v1.7. En una realización, el componente que contiene Na_v1.7 es una fracción de membrana. En una realización, el componente que contiene Na_v1.7 es una célula. En una realización, el componente que
10 contiene Na_v1.7 es un tejido del ratón.

En una realización, la determinación del efecto comprende medir la presencia o ausencia de una respuesta dependiente de Na_v1.7 en una célula derivada de un ratón como se describe en esta descripción. En una realización, la respuesta es un potencial de acción.

15 En un aspecto, se proporciona un método para la identificación de un modulador de un canal Na_v1.7 humano, quimérico o variante, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a un compuesto de ensayo y detectar la actividad o inactividad del canal Na_v1.7. En una realización, el método comprende ensayar compuestos de ensayo que modulan el flujo de iones sodio del canal Na_v1.7. En otra realización, el método comprende emplear la tecnología de pinzamiento zonal. En una realización específica, el método se usa para identificar compuestos fisiológicamente activos útiles para el tratamiento una patología del cerebro. En una
20 realización, la patología del cerebro se selecciona entre convulsiones, ataques epilépticos, trastornos de pánico, trastornos de hiperactividad, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos, demencia, déficit de memoria, déficit de atención, obesidad, ansiedad, trastornos alimenticios, adicción y abuso de la droga, deseo sexual alterado, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. En otra realización, la patología está relacionada con una respuesta visceral originada en el sistema límbico. En una realización, la respuesta visceral se selecciona entre respiración y función gastrointestinal.

En una realización, el modulador aumenta la actividad del canal Na_v1.7. En otra realización, el modulador disminuye la actividad del canal Na_v1.7.

En una realización, el canal Na_v1.7 humano, quimérico o humano variante está asociado con un trastorno del dolor. En una realización específica, el trastorno del dolor se selecciona entre insensibilidad congénita al dolor (CIP), eritromelalgia (IEM), y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

35 En un aspecto, se proporciona un método para determinar la probabilidad de enfermedad resultante de un canal Na_v1.7 variante, que comprende identificar mutaciones en uno o más sitios dentro una secuencia de ácido nucleico de un gen de Na_v1.7 aislado de una célula de un ratón como se describe en este documento que codifica una región N-terminal intracelular, un bucle extracelular en el dominio I, un bucle intracelular entre los dominios I y II, un bucle intracelular entre los dominios I y III, una región intramembrana del dominio II, o cualquier combinación de los mismos, donde las mutaciones identificadas codifican una proteína de canal Na_v1.7 que presenta un cambio en la función no observado en un canal Na_v1.7 no variante.

En una realización, el canal Na_v1.7 humano, quimérico o humano variante está asociado con un trastorno del dolor. En una realización específica, el trastorno del dolor se selecciona entre insensibilidad congénita al dolor (CIP), eritromelalgia (IEM), y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

50 En un aspecto, se proporciona un método para seleccionar una serie o lote de una preparación farmacéutica que contiene un agente terapéutico que se une a una secuencia de Na_v1.7 humano, que comprende exponer una célula que alberga una proteína Na_v1.7 que comprende al menos una secuencia humana contigua a una muestra de la serie o lote de la preparación farmacéutica, determinar si la muestra se une a la célula, y seleccionar una serie o lote que corresponda a la muestra que se unió a al menos una secuencia humana contigua. En una realización, la al menos una secuencia humana contigua codifica un bucle de poro extracelular de la proteína Na_v1.7. En una realización específica, el bucle de poro extracelular de la proteína Na_v1.7 se selecciona entre el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de los mismos. En una realización, el bucle de poro extracelular es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I. En una realización, el bucle de poro extracelular es el bucle que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III.

60 En una realización, la serie o lote de preparación farmacéutica comprende un compuesto no proteico de unión a Na_v1.7 humano. En una realización, la serie o lote de preparación farmacéutica comprende una proteína que se une a un Na_v1.7 humano. En una realización específica, la preparación farmacéutica que comprende una proteína incluye un anticuerpo.

65 En una realización, la célula que alberga una proteína Na_v1.7 que comprende al menos una secuencia humana

contigua está en un ratón en el momento en que la muestra de la serie o lote de la preparación farmacéutica se expone a la célula.

5 En un aspecto, se proporciona un método para determinar la eficacia de una proteína de unión a Na_v1.7 para mediar una respuesta resultante de un estímulo nociceptivo, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a la proteína de unión a Na_v1.7 y medir una respuesta nociceptiva del ratón al estímulo, donde una respuesta nociceptiva atenuada del ratón es un indicador de eficacia de la proteína de unión a Na_v1.7.

10 En una realización, la eficacia se determina para una serie o lote de preparación farmacéutica. En una realización específica, la eficacia se determina como una etapa de aseguramiento de la calidad o control de la calidad en la fabricación de la preparación farmacéutica para su uso en seres humanos.

15 En un aspecto, se proporciona un método para vincular selectivamente un receptor diana sobre la superficie de una célula neuronal, que comprende: poner en contacto una célula aislada de un ratón como se describe en este documento con uno o más mediadores inflamatorios, vinculando selectivamente de este modo el receptor diana; y, medir la liberación de un neuropéptido.

20 En una realización, el método se emplea como ensayo funcional para seleccionar un antagonista para el receptor diana.

En una realización, el receptor diana es una canal de sodio. En una realización específica, el canal de sodio es Na_v1.7.

25 En una realización, la célula neuronal es una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG).

En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre prostaglandina E₂, bradicinina, capsaicina, protones, pH bajo, y un factor neurotrófico.

30 En una realización, el neuropéptido es péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP).

En una realización, se proporciona un método para vincular selectivamente una proteína Na_v1.7 sobre la superficie de una DRG, que comprende exponer una DRG aislada de un ratón como se describe en este documento, a uno o más mediadores inflamatorios vinculando selectivamente de ese modo Na_v1.7 y medir la liberación de CGRP.

35 En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios comprenden prostaglandina E₂, bradicinina y capsaicina.

En una realización, el método se emplea como ensayo funcional para seleccionar un antagonista para Na_v1.7. En una realización específica, el antagonista es un anticuerpo.

40 En un aspecto, se proporciona un método para identificar un antagonista de Na_v1.7, que comprende: proporcionar *ex vivo* una célula que expresa una proteína Na_v1.7 humana o quimérica; poner en contacto la célula con un agente se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica; después de un periodo de tiempo subsecuente, poner en contacto la célula con uno o más mediadores inflamatorios; después de otro periodo de tiempo subsecuente, determinar la cantidad de péptido relaciona con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de la célula; y, comparar la cantidad de CGRP liberado de la célula en presencia del agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica con una muestra de referencia, donde un aumento en la liberación de CGRP sobre la muestra de referencia indica inhibición de Na_v1.7; y, determinar si el agente inhibe la función de Na_v1.7.

50 En una realización, la célula puede ser una célula no humana, preferiblemente una célula animal no humana. En una realización adicional, la célula puede ser una célula humana o no humana que expresa de forma exógena la proteína Na_v1.7 humana o quimérica. "Expresión exógena" de ese modo significa que la célula está genéticamente modificada para expresar la proteína Na_v1.7 humana o quimérica y no expresaría esta proteína sin modificación genética. La modificación genética puede incluir introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula que no contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula no humana), o cualquiera de sus precursores. La modificación genética también puede incluir la introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula que ya contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula humana), o cualquiera de sus precursores, donde el gen introducido está bajo el control de un promotor o promotores diferentes de los que controlan dicho gen ya presente en el genoma. Como ejemplo, las células humanas que expresan de forma exógena una proteína Na_v1.7 humana o quimérica pueden ser células HEK293 modificadas por ingeniería para expresar de forma estable proteína Na_v1.7 humana.

60 En una realización, el agente es un anticuerpo. En una realización específica, el anticuerpo es humano. En una realización, el agente es un péptido. En una realización, el agente es un compuesto orgánico no proteico. En una realización, el compuesto orgánico no proteico se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos 2-alkilalcanoicos (por ejemplo, ácido valproico y análogos del mismo), ácidos 3-alkilamino-alcanoicos (por ejemplo, gabapentina y análogos de la misma), 1-benzazapin-2-onas, bupivacaína, capsaicinas, flecainida, flunarizina,

lidocaína, mexiletina, fenitoína, propafenona, prostaglandinas, quinidina, saxitoxina, tetracaína, tetrodotoxina, y análogos de los mismos.

5 En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre prostaglandina E₂, bradicinina, capsaicina, protones, pH bajo, y un factor neurotrófico. En una realización específica, el uno o más mediadores inflamatorios son prostaglandina E₂, bradicinina, y capsaicina.

10 En una realización, la célula es una célula neuronal. En una realización específica, la célula neuronal es una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG). En una realización específica, la célula es una célula DRG de ratón. En una realización, la célula se aísla de un ratón como se describe en este documento. En una realización específica, la célula es una célula DRG aislada de un ratón como se describe en este documento.

15 En una realización, la cantidad de CGRP liberado en presencia del agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica es aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, o aproximadamente de 15 veces a aproximadamente 20 veces superior que la muestra de referencia. En una realización específica, el agente es una molécula no proteica. En una realización, la molécula no proteica es una toxina seleccionada entre tetrodotoxina y ProTx-II. En una realización específica, el agente es un anticuerpo. En una
20 realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-Na_v1.7.

25 En una realización, la muestra de referencia contiene un bloqueante de canales de sodio. En una realización específica, el bloqueante de canales de sodio inhibe una o más funciones de una proteína de canal de sodio por unión a e inhibición de una abertura de poro extracelular de la proteína de canal. En una realización, el bloqueante de canales de sodio que inhibe una o más funciones de una proteína de canal de sodio por unión a e inhibición de una abertura de poro extracelular de la proteína de canal es una toxina basada en alcaloide (por ejemplo, tetrodotoxina o saxitoxina). En una realización específica, el bloqueante de canales de sodio inhibe una o más funciones de un canal de sodio por unión a e inhibición de una parte intracelular del canal. En una realización, el
30 bloqueante de canales de sodio que inhibe una o más funciones de un canal de sodio por unión a e inhibición de una parte intracelular del canal es un anestésico local (por ejemplo, lidocaína). En una realización, el bloqueante de canales de sodio que inhibe una o más funciones de un canal de sodio por unión a e inhibición de una parte intracelular del canal es un anticonvulsivo (por ejemplo, gabapentina, carbamazepina, clonazepam, divalproex, lamotrigina, fenitoína, oxcarbazepina, tiagabina, topiramato y ácido valproico).

35 En una realización, la muestra de referencia contiene una toxina aislada del veneno de un artrópodo, un invertebrado, un pez, o un reptil. En una realización específica, el veneno tóxico se obtiene de una tarántula (por ejemplo, ProTx-II).

40 En un aspecto, se proporciona un método para identificar un antagonista de Na_v1.7, que comprende proporcionar *ex vivo* una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG) que expresa una proteína Na_v1.7 humana o quimérica, poner en contacto la DRG con un agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica y esperar un primer periodo de tiempo, y, después del primer periodo de tiempo, poner en contacto la DRG con uno o más mediadores inflamatorios y esperar un segundo periodo de tiempo, determinar la cantidad de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de la DRG, comparar la cantidad de CGRP liberado de la DRG en presencia del agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica con una muestra de referencia, donde un aumento en la liberación de CGRP sobre la muestra de referencia indica inhibición de Na_v1.7, y determinar si el agente inhibe la función de Na_v1.7 en la DRG.
45

50 En una realización, la célula DRG puede ser una célula DRG no humana. En una realización adicional, la célula DRG puede ser una célula DRG humana o no humana que expresa de forma exógena la proteína Na_v1.7 humana o quimérica. "Expresión exógena" de ese modo significa que la célula DRG está genéticamente modificada para expresar la proteína Na_v1.7 humana o quimérica y no expresaría esta proteína sin modificación genética. La modificación genética puede incluir introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula DRG que no contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula DRG no humana), o cualquiera de sus precursores. La modificación genética también puede incluir la introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula DRG que ya contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula DRG humana), o cualquiera de sus precursores, donde el gen introducido está bajo el control de un promotor o promotores diferentes de los que controlan dicho gen ya presente en el genoma.
55

60 En una realización, el agente es un anticuerpo. En una realización específica, el anticuerpo es humano. En una realización, el agente es un péptido. En una realización, el agente es un compuesto orgánico.

En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios son prostaglandina E₂, bradicinina y capsaicina.

65 En una realización, la DRG se aísla de un miembro del grupo que consiste en ser humano, ratón, rata, o mono. En una realización específica, la DRG se aísla de un ratón como se describe en este documento. En una realización, el

ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano o fragmento de la misma unida de forma funcional a un promotor Na_v .

5 En un aspecto, se proporciona un complejo *ex vivo*; donde el complejo *ex vivo* comprende una célula de ratón que expresa una proteína $\text{Na}_v1.7$ que comprende un dominio transmembrana de ratón y un dominio de bucle humano; y, un antagonista de $\text{Na}_v1.7$ unido al bucle humano. En una realización, la célula de ratón es una célula inmortalizada. En una realización, el antagonista de $\text{Na}_v1.7$ comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se une específicamente a un bucle de $\text{Na}_v1.7$ humano pero no a un bucle de $\text{Na}_v1.7$ de ratón.

10 En un aspecto, se proporciona un complejo *ex vivo*; donde el complejo *ex vivo* comprende una membrana o fragmento de la misma que comprende una proteína $\text{Na}_v1.7$ que comprende un dominio transmembrana de ratón y un dominio de bucle humano; y un antagonista de $\text{Na}_v1.7$ unido al bucle humano. En una realización, el antagonista de $\text{Na}_v1.7$ comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se une específicamente a un bucle de $\text{Na}_v1.7$ humano pero no a un bucle de $\text{Na}_v1.7$ de ratón.

15 Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en este documento pueden usarse unos junto con otros, salvo que se indique de otro modo o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de una revisión de la descripción consiguiente. Debe entenderse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivas.

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** muestra un diagrama de un canal Na_v .

25 La **FIG. 2** muestra el locus del gen de $\text{Na}_v1.7$ murino (parte superior) con los exones numerados por encima y por debajo del locus. El vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ de ratón (centro) se usó para remplazar una región de 81 kb del locus endógeno que abarco los exones 6-28 con un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP*. El alelo dirigido produce un locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno deleciónado (parte inferior).

30 La **FIG. 3** muestra el locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno deleciónado (parte superior) abordado con un vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ humano (centro). El locus endógeno deleciónado previamente abordado con un casete de neomicina se remplazó con un vector de direccionamiento que comprende los exones 2-28 de un locus de $\text{Na}_v1.7$ humano. El alelo dirigido provoca un locus endógeno que expresa la proteína $\text{Na}_v1.7$ humana.

35 La **FIG. 4** muestra el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón (parte superior) abordado con un vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ -DI/S5-S6 humano (centro). El alelo dirigido produce un locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno parcialmente humanizado que expresa una proteína $\text{Na}_v1.7$ quimérica que incluye un bucle de poro S5-S6 extracelular humano en el dominio I.

40 La **FIG. 5** muestra el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón (parte superior) abordado con un vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ -DIII/S5-S6 humano (centro). El alelo dirigido produce un locus del gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno parcialmente humanizado que expresa una proteína $\text{Na}_v1.7$ quimérica que incluye un bucle de poro S5-S6 extracelular humano en el dominio III.

La **FIG. 6A** muestra la latencia de retirada de la cola (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (golpe en la cola) en cohortes macho y hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano de longitud completa ($\text{Scn9A}^{\text{hum}/+}$).

45 La **FIG. 6B** muestra el umbral de retirada (en gramos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (pellizco en la cola) en cohortes macho y hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano de longitud completa ($\text{Scn9A}^{\text{hum}/+}$).

La **FIG. 6C** muestra la latencia de retirada de la pata (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (placa de calor de 52 °C y 55 °C) en cohortes de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano de longitud completa ($\text{Scn9A}^{\text{hum}/+}$).

50 La **FIG. 7A** muestra la latencia de retirada de la cola (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (golpe en la cola) en cohortes hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $\text{Na}_v1.7$ quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I ($\text{Scn9A}^{3.1/3.1}$).

55 La **FIG. 7B** muestra el umbral de retirada (en gramos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (pellizco en la cola) en cohortes hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $\text{Na}_v1.7$ quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I ($\text{Scn9A}^{3.1/3.1}$).

60 La **FIG. 7C** muestra la latencia de retirada de la pata (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (placa caliente de 52 °C y 55 °C) en cohortes hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $\text{Na}_v1.7$ quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I ($\text{Scn9A}^{3.1/3.1}$).

65 La **FIG. 7D** muestra alodinia mecánica medida como umbral de retirada de la pata (en gramos) antes (medida inicial) y después (Post-CFA) de la administración de adyuvante completo de Freund en cohortes hembra de tipo silvestre ($\text{Scn9A}^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $\text{Na}_v1.7$ quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I ($\text{Scn9A}^{3.1/3.1}$).

La **FIG. 7E** muestra hiperalgnesia térmica medida como umbral de retirada de la pata (en gramos) antes (medida

inicial) y después (Post-CFA) de la administración de adyuvante completo de Freund en cohortes hembra de tipo silvestre (*Scn9A^{+/+}*) y ratones homocigóticos para el gen de Na_v1.7 quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I (*Scn9A^{3.1/3.1}*).

La **FIG. 7F** muestra el porcentaje de cambio desde la medida inicial en respuesta a estímulos nociceptivos en cohortes hembra de tipo silvestre (*Scn9A^{+/+}*) y ratones homocigóticos para el gen de Na_v1.7 quimérico que contiene un bucle de poro extracelular humano que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I (*Scn9A^{3.1/3.1}*).

La **FIG. 8** muestra la concentración (pg/ml) de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de tres poblaciones de ganglios de raíz dorsal (DRG) asiladas de ratones de tipo silvestre en respuesta a exposición a una mezcla inflamatoria (IM), 20 minutos pre-incubación con TTX 1 μM seguido por adición de una mezcla inflamatoria (TTX 1 μM e IM) o incubación con TTX 1 μM más una mezcla inflamatoria durante 20 minutos (TTX 1 μM + IM).

Descripción detallada

Esta invención no está limitada a métodos particulares, y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También se entiende que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones usadas en este documento incluyen los significados que los términos y expresiones han obtenido en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea evidente claramente del contexto en que se usa el término o expresión. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales particulares. Todas las publicaciones mencionadas por la presente se incorporan por referencia.

La expresión "vector de direccionamiento" o "construcción de direccionamiento" incluye una molécula polinucleotídica que comprende una región de direccionamiento. Una región de direccionamiento comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración de la construcción de direccionamiento en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal mediante recombinación homóloga.

También se incluyen las regiones de direccionamiento que dirigen usando sitios de reconocimiento de recombinasa específica de sitio (por ejemplo, sitios lox o FRT).

En una realización específica, la construcción de direccionamiento comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico o gen de interés particular, un marcador de selección, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácido nucleico que permiten recombinación mediada a través de la adición exógena de proteínas que ayudan a o facilitan la recombinación que implica dichas secuencias. En otra realización específica, la construcción de direccionamiento comprende adicionalmente un gen de interés, donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína que tiene una función similar a la proteína codificada por la secuencia endógena.

El término "reemplazo" incluye cuando una secuencia de ADN se coloca en un genoma de una célula de tal modo que reemplace una secuencia dentro del genoma, en el locus de la secuencia genómica, con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia humana en un ratón). La secuencia de ADN así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte del ADN fuente usado para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones no traducidas 5' ó 3', etc.). Por ejemplo, en diversas realizaciones, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena por una secuencia heteróloga que provoca la producción de un producto génico de la secuencia de ADN así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero sin expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una función similar a la proteína codificada por la secuencia genómica endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica un canal Na_v, y el fragmento de ADN codifica uno o más canales Na_v humanos). En diversas realizaciones, se reemplaza un gen endógeno o fragmento del mismo con un gen humano correspondiente o fragmento del mismo. Un gen humano correspondiente o fragmento del mismo es un gen humano o fragmento que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar a o igual en estructura y/o función, al gen endógeno o fragmento del mismo que se reemplaza.

La expresión "canal Na_v" incluye un canal de sodio abierto por voltaje, por ejemplo, un canal Na_v1.7. Los genes de canal Na_v incluyen una subunidad-α que se expresa sobre la superficie de la célula y sirve como puerta que permite el flujo de entrada de Na⁺ en la célula a través de un poro formado por segmentos transmembrana que son parte de la subunidad-α. La subunidad-α se asocia con otras subunidades, por ejemplo, β1, β2, β3 y β4, para realizar potenciales de acción. Existen varios genes diferentes de canal Na_v y pueden clasificarse por sensibilidad a toxinas de pez globo (tetrodotxina, o TTX). Los canales sensibles a TTX, es decir, aquellos bloqueados por bajas concentraciones nanomolares de TTX, incluyen Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.4, Na_v1.6 y Na_v1.7. Los canales resistentes a TTX, es decir, aquellos bloqueados por concentraciones μM de TTX, incluyen Na_v1.5, Na_v1.8 y Na_v1.9.

Dentro de los genes de canal Na_v , se han descrito subtipos o mutantes en sujetos humanos. A modo de ilustración, se proporcionan secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un gen de $Na_v1.7$ humano en las SEC ID N° 42 y 43, respectivamente. Los especialistas en la técnica tras la lectura de esta descripción reconocerán que uno o más genes de canal Na_v endógeno en un genoma (o todo) puede remplazarse por uno o más genes de canal Na_v heterólogo (por ejemplo, subtipos o mutantes, genes de otra especie, formas quiméricas, etc.).

El término "variantes" incluye variaciones de una secuencia normal de un gen que provoca una serie de formas diferentes del mismo gen. Las diferentes formas pueden comprender diferencias de hasta, por ejemplo, 20 aminoácidos en la secuencia de una proteína de un gen. Por ejemplo, puede entenderse que los alelos son secuencias alternativas de ADN en el mismo locus génico físico, que pueden producir o no diferentes rasgos (por ejemplo, características fenotípicas heredables) tales como susceptibilidad a ciertas enfermedades o afecciones que no producen otros alelos para el mismo gen o producen grados variables en los otros alelos.

Una "célula excitable" incluye una célula que está implicada en la generación de potenciales de acción en estimulación. Células excitables ejemplares incluyen neuronas, miocitos y electrocitos. Las células excitables cambian el potencial eléctrico de sus membranas en estimulación de un modo repentino y reversible para transmitir señales eléctricas a otras células excitables proporcionando de ese modo comunicación célula a célula. Por ejemplo, la contracción de músculos voluntarios está controlada por potenciales de acción mediante neuronas que inervan las fibras musculares. En diversas realizaciones, los animales no humanos modificados genéticamente de la presente invención presentan potenciales de acción controlados por la expresión de las proteínas $Na_v1.7$ humanas y/o quiméricas sobre la superficie de neuronas en diversos tipos de tejidos, por ejemplo, músculo, dentro del animal no humano.

Una "neurona" incluye una célula nerviosa y es una célula especializada que muestra, por ejemplo, excitabilidad eléctrica. Las neuronas, como se describe en este documento, forman uniones complejas de membrana con otras neuronas para formar un contacto que permite de ese modo que una neurona transmita señales a otra. Dichos contactos entre neuronas se mencionan en la técnica como sinapsis, que pueden ser excitatorias o inhibitorias. Las neuronas pueden ser parte del sistema nervioso central de un animal o encontrarse en la periferia del animal en otro tejido nervioso especializado, por ejemplo, ganglios. Por ejemplo, algunas neuronas están situadas en órganos sensoriales tales como la retina y la cóclea.

El término "alteración" se usa para referirse a cuando un fragmento de ADN recombina con una secuencia homóloga endógena, por ejemplo, un gen o locus génico. Estas alteraciones de secuencia pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones, remplazos, contrasentido, o un desplazamiento de fase de secuencia de ADN, o cualquier combinación de los mismos. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo, exógenos, que pueden ser de un origen diferente a la secuencia endógena. La alteración de una secuencia homóloga endógena puede alterar la proteína producida a partir de un gen normal de modo que se inhiba completamente o en parte, o mediante la producción de proteína a partir de un gen alterado puede potenciarse sobre el nivel normal de producción a partir de la secuencia homóloga endógena no alterada. En una realización, la alteración provoca una ausencia de proteína funcional producida a partir de la secuencia homóloga endógena. En otra realización, la alteración no efectos significativos sobre la expresión del gen.

La expresión "locus endógeno" se refiere al locus génico de origen natural encontrado en un animal huésped de tipo silvestre que no está interrumpido, delecionado, remplazado o alterado. En una realización, el locus endógeno está delecionado. En otra realización, el locus endógeno está alterado, donde una parte del locus endógeno está remplazado con una secuencia heteróloga. En otra realización, todo o sustancialmente todo el locus endógeno está remplazado con un locus heterólogo. En una realización, el locus heterólogo es un locus humano.

El término "heterólogo" cuando se usa junto con polipéptido o gen se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos o un ADN que codifica el polipéptido que no se encuentra en el animal hospedador no humano. Por tanto, un ratón modificado genéticamente que tiene un gen de canal Na_v humano puede describirse como que tiene un gen de canal Na_v heterólogo. El gen de canal Na_v remplazado puede detectarse usando varios métodos incluyendo, por ejemplo, PCR, transferencia de Western, transferencia de Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o una ganancia o pérdida de ensayo de alelos.

La expresión "promotor endógeno" se refiere al promotor que está asociado de forma natural, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína endógena.

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen aquellas procariotas y eucariotas (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, etc.), células micobacterianas, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO

5 K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de la retina, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula Sertoli, BRL célula 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula de la retina que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™).

10 La expresión "animales no humanos" pretende incluir cualquier vertebrado tal como ciclóstomos, peces óseos, peces cartilagosos tales como tiburones y rayas, anfibios, reptiles, mamíferos, y aves. Los mamíferos adecuados incluyen primates no humanos, cabras, ovejas, cerdos, perros, vacas y roedores. Los animales no humanos adecuados se seleccionan entre la familia de roedores incluyendo rata y ratón. En una realización, los animales no humanos son ratones.

15 El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución de aminoácido conservativa, incluye sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable de unirse específicamente a un epítipo diana con una afinidad deseada. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales alifáticas-hidroxilo tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservativas de aminoácido incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución conservativa de aminoácido puede ser una sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se hace una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad log PAM250 descrita en Gonnet, G.H., Cohen, M.A., y Benner, S.A. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45, incorporada por la presente por referencia. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad log PAM250.

35 El término "identidad" cuando se usa en relación con una comparación de secuencias, incluye identidad determinada por varios logaritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en este documento, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) que emplea una penalización por abertura de hueco de 10,0, una penalización por hueco extendido de 0,1, y usando una matriz de similitud Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

40 El término "anticuerpo", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios de IgG, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} y un cuarto dominio, C_{H4} , en el caso de regiones constantes de IgM e IgE. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio de un tipo κ o λ (C_{κ} o C_{λ}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

55 La expresión "anticuerpo humano", como se describe en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, y pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se describe en este documento, no pretende incluir anticuerpos en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

60 Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante", como se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a una molécula diana (por ejemplo, Na_v1.7) provoca la inhibición de al menos una función de la molécula diana. Por ejemplo, la inhibición causada por un anticuerpo neutralizante o bloqueante de Na_v1.7 no tiene que ser completa siempre que sea detectable usando un ensayo apropiado. Ensayos ejemplares para detectar la inhibición de Na_v1.7 se describen en otra parte en este documento.

La expresión "intervalo micromolar" pretende indicar 1-999 micromolar; la expresión "intervalo nanomolar" pretende indicar 1-999 nanomolar; la expresión "intervalo picomolar" pretende indicar 1-999 picomolar.

Expresión y función del canal Na_v

Existen nueve miembros conocidos de la familia de canales Na_v. Los nombres de los genes son SCN1A a SCN11A, y las proteínas respectivas se denominan Na_v1.1-Na_v1.9. Cada uno se ha clasificado adicionalmente basándose en su sensibilidad a toxina de pez globo (tetrodotoxina, o TTX). Se ha informado de que los nueve canales Na_v muestran diversas propiedades funcionales y distintos patrones de expresión, que implican funciones especializadas entre los canales. La expresión de canales Na_v puede detectarse, por ejemplo, en neuronas de los sistemas nervioso central y periférico, miocitos cardiacos, músculo esquelético, células de la glia, y células de Schwann. Na_v1.7, un canal Na_v sensible a TTX también conocido como PN1 y SCN9A, se ha detectado en neuronas simpáticas, células de Schwann, células neuroendocrinas y ganglios de la raíz dorsal (DRG). Na_v1.7 se expresa casi exclusivamente en DRG y se concentra en las puntas de estas neuronas especializadas. Dicha distribución predispone a este canal a un papel en la transmisión de señales de dolor.

Los canales Na_v contienen una subunidad- α (FIG. 1) que forma un poro en la membrana de células que permite el flujo de iones Na⁺ mediando de ese modo potenciales de acción. Esta subunidad- α también se asocia con una a dos subunidades- β , que funcionan en la regulación de la abertura del canal. La expresión de la subunidad- α sobre la superficie de la célula parece ser necesaria para la función del canal. Los canales Na_v se abren y cierran a través de un poro, que está compuesto por los segmentos 5 (S5) y 6 (S6) transmembrana de cada uno de los dominios (FIG. 1). Es a través de este poro formado por la disposición cíclica de los cuatro dominios en la superficie celular que los iones Na⁺ se mueven al interior de la célula y causan despolarización de la membrana celular. Esta acción cambia el gradiente electroquímico de la célula y genera un potencial de acción, que conduce a la transmisión de señales eléctricas entre células. Estudios de mutación han demostrado que los aminoácidos que componen los bucles que conectan los segmentos transmembrana tanto en el lado extracelular como en el lado intracelular de la célula regulan la abertura y cierre del canal de un modo tipo puerta-receptor. Dichas mutaciones alteran y/o desestabilizan el estado del canal dejando el canal en un estado "activado" o "inactivado" perpetuo, por lo tanto, causando lo que se llama como canalopatías, por ejemplo, hiperexcitabilidad, que conduce a estados de dolor severos y persistentes.

Na_v1.7 y vías de dolor

Entre los canales Na_v, Na_v1.7 está asociado con una activación e inactivación rápida, y se ha postulado que actúa como canal umbral. Estudios genéticos han ligado Na_v1.7 tanto a dolor severo como a indiferencia al dolor. Por ejemplo, la eritromelalgia (IEM) y el trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD) resultan de mutaciones en Na_v1.7 que aumentan la actividad del canal desplazando la activación del canal a un potencial más negativo o alterando la inactivación. Se han descrito otras mutaciones que conducen a una proteína Na_v1.7 no funcional y por tanto una ausencia completa de dolor, llamada indiferencia congénita al dolor (CIP). Las mutaciones CIP, aunque alteran la capacidad de oler, parecen no tener efecto sobre las funciones motoras, cognitivas y cardiacas. Se ha informado de varias mutaciones en Na_v1.7 referidas a IEM, PEPD y CIP y el efecto aberrante resultante sobre la función de Na_v1.7. También se ha sugerido que Na_v1.7 tiene un papel en la metástasis debido al descubrimiento de que Na_v1.7 está regulado positivamente en algunas líneas celulares cancerosas. Además, se ha demostrado que el factor de crecimiento nervioso (NGF) aumenta los niveles de Na_v1.7, lo que ha sugerido una relación con dolor inflamatorio. Por consiguiente, estos hallazgos indican que Na_v1.7 está implicado en varios puntos de control críticos para la percepción de dolor, inflamación y, quizá, la persistencia de cáncer.

Terapias convencionales empleando inhibidores no selectivos de canales de sodio tales como, por ejemplo, lidocaína, mexiletina, y carbamacepina muestran algún valor en el tratamiento del dolor, sin embargo, están limitados debido a los significativos efectos secundarios motores, cognitivos y cardiacos de su inhibición sobre canales Na_v no implicados en la respuesta del dolor. El uso de analgésicos, anticonvulsivos y antiarrítmicos para tratar actividad anormal de Na_v ha reunido resultados similares. Esto revela la importancia y necesidad inmediata de inhibidores específicos de Na_v. La identificación de agentes terapéuticos que inhiban selectivamente Na_v1.7 podría demostrar ser eficaz para tratar el dolor y la inflamación en seres humanos y la evaluación de dichos agentes terapéuticos requiere un modelo animal adecuado que exprese Na_v1.7 humano. La presente invención cumple esta y otras necesidades.

Se ha demostrado difícil la construcción de líneas celulares que expresen de forma estable proteínas de canal Na_v y por tanto el desarrollo de modelos animales adecuados para dilucidar la función del canal Na_v e identificar inhibidores específicos de canales Na_v se ha visto afectado de forma adversa. Además, la delección de Na_v1.7 murino es letal, causada por una presunta disminución en el olfato, que se ha postulado que provoca fallo en la alimentación. Se ha conseguido la delección de Na_v1.7 dentro de subconjuntos de células y se confirmó un papel en mecanismos de dolor, pero la aplicabilidad de este enfoque no está sin limitación. Un ratón en que la proteína completa y/o partes específicas de la proteína Na_v1.7 humana se expresa, en diversas realizaciones podría usarse para reflejar de forma precisa los mecanismos de dolor humano y patologías asociadas con trastornos provocadas por mutaciones de Na_v1.7. Dicho ratón serviría como herramienta vital en el diseño, análisis y evaluación de agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos de dolor humano tales como, por ejemplo, IEM, PEPD, dolor crónico y

agudo, y dolor inflamatorio, proporcionando un modelo animal capaz de conseguir una expresión más precisa y perfil de función de procesos del canal Na_v en seres humanos. Además, líneas celulares derivadas de dichos ratones serían herramientas excepcionalmente útiles para evaluar agentes terapéuticos humanos.

5 Ratones que expresan canales $\text{Na}_v1.7$ heterólogos

Se proporcionan animales no humanos genéticamente modificados que expresan la proteína $\text{Na}_v1.7$ completa o parcialmente humana. La proteína $\text{Na}_v1.7$ puede expresarse sobre la superficie de células excitables, por ejemplo neuronas, del sistema nervioso del animal.

10 La modificación genética, en diversas realizaciones, comprende una delección de un gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón funcional por completo o en parte, y en algunas realizaciones una modificación adicional que comprende un remplazo con un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano por completo o en parte, donde el animal no humano expresa subunidades- β de ratón funcionales. También se proporcionan embriones, células y construcciones de direccionamiento no humanos genéticamente modificados para crear animales no humanos, embriones no humanos, y células.

15 Se proporcionan composiciones y métodos para crear un ratón que exprese una proteína $\text{Na}_v1.7$ humana, que incluye variantes específicas (por ejemplo, diferencias de un único aminoácido), incluyendo composiciones y métodos para crear un ratón que exprese dichos genes de un promotor de ratón y una secuencia reguladora de ratón. Los métodos incluyen volver de forma selectiva a un gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno no funcional (por ejemplo, mediante una delección de su subunidad- α), y emplear una subunidad- α de un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano en el locus génico de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno para expresar un gen de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano en un ratón. La delección del gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón se prepara por delección del gen de subunidad- α , pero no un gen de subunidad- β . El enfoque vuelve de forma selectiva el gen de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ endógeno no funcional reteniendo al mismo tiempo una subunidad- β endógena funcional.

20 El enfoque de remplazo de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ endógena emplea una alteración relativamente mínima en la transducción natural de señales mediada por $\text{Na}_v1.7$ en el animal, en diversas realizaciones, porque la secuencia genómica de las subunidades- α de $\text{Na}_v1.7$ se reemplazan en un único fragmento y por lo tanto retienen la funcionalidad normal mediante la inclusión de las secuencias reguladoras necesarias. Por tanto, en dichas realizaciones la modificación de la subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ no afecta a otros genes de cana Na_v endógenos dependientes de subunidades- β funcionales. Además, en diversas realizaciones, la modificación no afecta al ensamblaje de un complejo receptor funcional que implica una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ y una subunidad- β endógena, que se cree que son necesarias para la apropiada abertura de canales y la modulación de la expresión de canales de subunidades- α de $\text{Na}_v1.7$ sobre la superficie celular y para la señalización corriente abajo resultante de un canal activado. Como las subunidades- β no se delecionan, los animales que contienen un remplazo de un gen de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ endógeno con un gen de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano deben ser capaces de procesar las funciones normales de canales Na_v abiertos por voltaje a partir del paso de Na^+ al interior de la célula a través del poro de la subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano presente sobre la superficie de neuronas.

25 Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno delecionado en la FIG. 2. Como se ilustra, la subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ de ratón está codificada por 28 exones que abarcan más de 80 kb de secuencia. El gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno se deleciona mediante una construcción de direccionamiento (Vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ de ratón) con un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. Este locus endógeno codifica la subunidad- α del gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón responsable de la generación de potenciales de acción desencadenados por la despolarización de la membrana celular en respuesta a flujo de iones Na^+ al interior de la célula.

30 Un ratón genéticamente modificado que carece de una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad- α del gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno puede crearse mediante un método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede prepararse un vector de direccionamiento que deleccione el gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón con gen marcador de selección. La FIG. 2 ilustra un genoma de ratón (parte inferior) abordado por una construcción de direccionamiento que tiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia cadena arriba del exón 6 del locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno, seguido de un casete de selección con fármaco (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado por secuencias *loxP*), y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia cadena abajo del exón 27 del locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno. Tras la recombinación homóloga en el locus, el locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno se reemplaza por un casete de selección con fármaco (FIG. 2, parte inferior). El locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno de ese modo se deleciona produciendo una célula o animal no humano que no expresa subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ endógena. El casete de selección con fármaco puede retirarse opcionalmente por la posterior adicional de una recombinasa (por ejemplo, por tratamiento con Cre).

35 Modificar genéticamente un ratón para volver el gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno no funcional, en diversas realizaciones, produce un ratón que muestra defectos en los procesos del sistema nervioso, por ejemplo la transmisión de información nociceptiva, haciendo que el ratón sea útil para evaluar el papel del gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno en función neuronal normal y alterada. En diversas realizaciones, modificar la subunidad- α del gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno, pero

no las subunidades- β , evita la reducción potencial de otros genes de Na_v (por ejemplo, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.8$, $\text{Na}_v1.9$, etc.) que requieren las subunidades- β para regular la abertura por voltaje del canal, manteniendo de ese modo otras diversas funciones y procesos mediados a través de procesos dependientes de subunidad- β .

5 De acuerdo con informes, deleciones completas del gen de $\text{Na}_v1.7$ endógeno en ratones son letales. Sin embargo, se han conseguido deleciones en subconjuntos específicos de células y parecen por lo demás normales. Los ratones de acuerdo con la presente invención tienen un locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno funcionalmente silenciado porque la carecen de la capacidad de producir una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ funcional sobre la superficie celular.

10 Se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno remplazado con un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano en la FIG. 3. Como se ilustra, un locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno que se había delecionado se reemplaza por una construcción de direccionamiento (vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ humano) con un casete de higromicina flanqueado por sitios recombinantes. El locus reemplazado resultante codifica una proteína de subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano expresada sobre la superficie de neuronas en el animal hospedador capaz de mediar potenciales de acción desencadenados por la despolarización de la célula en respuesta al flujo de iones Na^+ al interior de la célula dentro del animal hospedador.

Un ratón modificado genéticamente que expresa una subunidad- α de $\text{Na}_v1.7$ humano en el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno puede crearse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede prepararse un vector de direccionamiento que introduce el gen de $\text{Na}_v1.7$ humano con un gen marcador de selección. La FIG. 3 ilustra un genoma de ratón que comprende un remplazo del locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno (parte inferior). La construcción de direccionamiento contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia cadena arriba del locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno, seguido de un fragmento genómico que contiene un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano, un casete de selección con fármaco (por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina flanqueado en ambos lados por secuencias *loxP*), y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia cadena abajo del locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno. Tras la recombinación homóloga en el locus endógeno, se reemplaza el casete de selección con fármaco por la secuencia contenida en el vector de direccionamiento (parte inferior de la FIG. 3). El locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno delecionado se reemplaza de ese modo con un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano produciendo una célula o animal que expresa un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano. El casete de selección con fármaco puede retirarse opcionalmente por la posterior adición de una recombinasa (por ejemplo, por tratamiento con Cre).

Pueden conseguirse otras modificaciones del locus endógeno con esfuerzo mínimo usando técnicas similares para crear un locus que comprende un gen quimérico. Por ejemplo, se proporcionan ilustraciones esquemáticas del remplazo de dos bucles de poro extracelular entre los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I y III del gen de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno en la FIG. 4 y FIG. 5, respectivamente. Como se ilustra, se insertan partes concretas de un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano en el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno mediante otras construcciones de direccionamiento (vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ DI/S5-S6 humano y vector de direccionamiento de $\text{Na}_v1.7$ DIII/S5-S6 humano) con fragmentos genómicos que codifican cada uno un bucle extracelular de un gen de $\text{Na}_v1.7$ humano localizado en el poro del canal y responsable de permitir el pase de iones Na^+ al espacio intracelular. Tras la recombinación con uno cualquiera de los vectores de direccionamiento ilustrados, se reemplaza un fragmento genómico del locus de $\text{Na}_v1.7$ endógeno, que codifica un bucle de poro extracelular de la proteína $\text{Na}_v1.7$ endógena, con un fragmento genómico humano que codifica el correspondiente bucle de poro en una proteína $\text{Na}_v1.7$ humana. Esto crea un locus quimérico que produce una proteína $\text{Na}_v1.7$ quimérica que comprende bucles extracelulares humanos en el poro de una proteína de canal $\text{Na}_v1.7$.

Un ratón modificado genéticamente que exprese un bucle de poro extracelular de un canal $\text{Na}_v1.7$ humano en el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno puede crearse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede prepararse un vector de direccionamiento que introduzca un fragmento genómico que codifica un bucle de poro extracelular de un canal $\text{Na}_v1.7$ humano con un gen marcador de selección. Las FIG. 4 y 5 ilustran cada una un genoma de ratón que comprende remplazos diferentes de bucles extracelulares localizados en el poro de una proteína de canal $\text{Na}_v1.7$. Cada construcción de direccionamiento contiene un brazo de homología 5' que contiene la secuencia cadena arriba de la secuencia de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógena a reemplazar, seguido de un fragmento genómico que contiene una secuencia humana correspondiente a la secuencia génica de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógena que codifica un bucle de poro extracelular específico, un casete de selección con fármaco (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado en ambos lados por secuencias *loxP*), seguido de un brazo de homología 3' que contiene la secuencia cadena abajo de la secuencia de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógena a reemplazar. Tras la recombinación homóloga en el locus endógeno con cualquiera de los vectores de direccionamiento, se inserta un fragmento genómico en el locus de $\text{Na}_v1.7$ de ratón endógeno que produce un locus quimérico capaz de expresar una proteína de canal $\text{Na}_v1.7$ que comprende una secuencia humana correspondiente a un bucle de poro extracelular (FIG. 4 y 5, parte inferior). El casete de selección con fármaco puede retirarse opcionalmente por la posterior adición de una recombinasa (por ejemplo, por tratamiento con Cre).

Modelos experimentales de ratones humanizados para $\text{Na}_v1.7$

65 Los animales no humanos modificados genéticamente que expresan genes de $\text{Na}_v1.7$ humanos son útiles, por

ejemplo, para dilucidar las diversas funciones de Na_v1.7 en las células del sistema nervioso, para medir la eficacia de un agente terapéutico que se una a la proteína Na_v1.7 expresada sobre la superficie celular, para determinar el papel de un canal Na_v1.7 en mecanismo de dolor y trastornos del dolor, para servir como modelos de dolor agudo y/o crónico, y para servir como compañeros de cría para generar otros ratones modificados genéticamente de interés. También son útiles para preparar fracciones de membrana o vesículas que comprenden proteínas Na_v1.7 completamente humanas o quiméricas humanas-de ratón, para identificar antagonistas de Na_v1.7 humano.

En una realización, se usa un ratón de acuerdo con la invención para determinar el mecanismo de abertura de canales que está regulado por los bucles extracelulares localizados en el poro de canales Na_v humanos. En una realización, se inyecta a un ratón de la presente invención toxinas que se unen a bucles de poro extracelular de un canal Na_v humano sobre la superficie celular y, después de un periodo posterior de tiempo, se somete a un intervalo de estímulos para desencadenar el disparo de potenciales de acción. La identidad de la toxina es conocida antes de la inyección y los animales se analizan para alteración de respuestas eléctricas dependientes de Na_v1.7 por comparación con respuestas eléctricas observadas en animales de tipo silvestre.

En otro aspecto, se proporcionan animales no humanos modificados genéticamente que comprenden un remplazo del gen de Na_v1.7 endógeno con un gen de Na_v1.7 humano. Dichos animales son útiles para estudiar la eficacia de agentes terapéuticos para bloquear la función de Na_v1.7. Además, se ha demostrado que Na_v1.7 humano muestra formas mutantes asociadas con enfermedad (por ejemplo, IEM, PEPD y CIP). Por tanto, pueden usarse animales no humanos modificados genéticamente que comprenden un remplazo de gen de Na_v1.7 endógeno con formas mutantes específicas de genes de Na_v1.7 humanos para estudiar trastornos humanos asociados con mutaciones de Na_v1.7 en el animal. En una realización específica, las formas mutantes de Na_v1.7 humano están asociadas con la respuesta de dolor.

Variantes adecuadas incluyen formas mutantes de Na_v1.7 humano que se conocen en la técnica. Las variantes asociadas con el trastorno IEM incluyen, por ejemplo, mutaciones de desplazan la activación de Na_v1.7 a un potencial más negativo. Mutaciones ejemplares de Na_v1.7 que conducen a IEM incluyen Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G y F1449V. En una realización, la secuencia de Na_v1.7 humano comprende una mutación contrasentido que causa el trastorno IEM. En una realización específica, la mutación contrasentido que causa el trastorno IEM se selecciona entre I848T y L858H.

Las variantes asociadas con el trastorno PEPD incluyen, por ejemplo, mutaciones que comprometen la inactivación de una subunidad- α de Na_v1.7. Se ha demostrado que mutaciones que causan PEPD desplazan la inactivación rápida en estado estacionario de una subunidad- α de Na_v1.7 hacia un estado caracterizado por potenciales más despolarizados causando un notable aumento en la corriente continua. Se ha informado de que dichas mutaciones suceden, por ejemplo, en los aminoácidos que unen DIII y DIV, que contiene un motivo de inactivación asociado con la inactivación de la subunidad- α de Na_v1.7. Mutaciones ejemplares de Na_v1.7 que conducen a PEPD incluyen R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K y A1632E. En una realización, la secuencia de Na_v1.7 humano comprende una mutación seleccionada entre I1461T, M1627K y A1632E.

Las variantes asociadas con el trastorno CIP incluyen, por ejemplo, mutaciones sin sentido homocigóticas de un único nucleótido y mutaciones heterocigóticas compuestas, que incluyen mutaciones sin sentido en un alelo y una mutación de delección en el otro alelo. La mutación de delección puede ser de secuencias codificantes o no codificantes, la última de las cuales puede conducir a corte y ajuste defectuoso que silencia funcionalmente la subunidad- α de Na_v1.7. Las mutaciones sin sentido son cambios en la secuencia de ADN, que introducen codones de parada prematuros, causando que cualquier proteína resultante se acorte de forma anormal. Esto puede causar una pérdida de función en la proteína, ya que partes críticas de la cadena de aminoácidos ya no se traducen. Por consiguiente, animales no humanos de la presente invención que comprenden una subunidad- α de Na_v1.7 humano con una mutación que silencia funcionalmente la subunidad- α de Na_v1.7 humano muestran una ausencia de dolor en respuesta a estímulos nociceptivos.

Mutaciones ejemplares de silenciamiento en un gen de Na_v1.7 incluyen mutaciones sin sentido, delecciones de uno o más nucleótido en una secuencia de ADN de Na_v1.7, mutaciones en la unión de corte y ajuste de exones, y mutaciones de desplazamiento de fase. En una realización, el animal no humano modificado genéticamente es heterocigótico para una mutación de silenciamiento que conduce a CIP, donde un alelo de un gen de Na_v1.7 comprende una mutación sin sentido y el otro alelo de Na_v1.7 comprende una mutación de desplazamiento de fase seleccionada entre F1200L e I1235L. En otra realización, el animal no humano modificado genéticamente es homocigótico para una mutación sin sentido que conduce a CIP. En una realización, la mutación sin sentido comprende una proteína de subunidad- α de Na_v1.7 truncada que finaliza en un resto de aminoácido seleccionado entre 259, 277, 328, 459, 693, 767, 830, 897, 1488, 1659 y 1689. En una realización específica, la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano finaliza en un resto de aminoácido seleccionado entre 693 y 1488.

Se analizó la expresión de Na_v1.7 de ratón en ratones completos usando un sistema indicador que comprendía una fusión de un gen indicador LacZ con Na_v1.7 de ratón. El análisis de la señal LacZ en ratones completos reveló que Na_v1.7 se expresa en todo el sistema nervioso de ratones, incluyendo en cerebro (incluyendo ganglios de bulbo

olfatorio), tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente troncoencefálico, médula, colículo, núcleo óptico, corteza cerebral, materia gris de la médula espinal (por ejemplo, dorsal/sensorial), ganglios de la raíz dorsal, cadena de ganglios simpáticos, ganglios trigéminos, ganglio celiaco, plexo nervioso intestinal, y en ganglios más pequeños en todo el organismo (por ejemplo, lengua, esófago, tráquea, bronquios, corazón).

5 Por tanto, pueden prepararse células, líneas celulares, y cultivos celulares a partir de los tejidos mencionados anteriormente como una fuente de proteína $Na_v1.7$ de ratón. Además, los ratones modificados genéticamente de acuerdo con la invención expresan $Na_v1.7$ parcial o completamente humanizado sobre los tejidos mencionados anteriormente. Por tanto pueden generarse tejidos y células de los ratones modificados genéticamente, incluyendo
10 líneas celulares y cultivos celulares, para servir como fuente de $Na_v1.7$ humanizado para su uso en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para ensayar la unión o función de un agonista o antagonista de $Na_v1.7$, particularmente donde el agonista o antagonista es específico para una secuencia de $Na_v1.7$ humano.

15 Las células de ratones modificados genéticamente pueden aislarse y usarse en una base ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo durante muchas generaciones. En una realización, las células de los ratones modificados genéticamente se inmortalizan y se mantienen en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

En un aspecto, los ratones modificados genéticamente se usan para preparar ganglios modificados de la raíz dorsal (DRG) que comprenden una o más proteínas $Na_v1.7$ modificadas. Los DRG modificados se emplean en ensayos *ex vivo* para determinar el efecto de un agente de unión a $Na_v1.7$ sobre la función de la proteína $Na_v1.7$ y sobre la
20 función de otras proteínas, por ejemplo, otros miembros de la familia Na_v . En una realización, los DRG modificados de un ratón se aíslan y ensayan para una o más funciones de $Na_v1.7$ en presencia y ausencia de un agente de unión a $Na_v1.7$ (por ejemplo, un agonista o antagonista de $Na_v1.7$). En una realización, los DRG modificados se aíslan y ensayan para la función de uno o más miembros de la familia Na_v en presencia y ausencia de un agente de unión a
25 $Na_v1.7$. En una realización, los DRG modificados se ensayan en presencia del agente de unión para la función de una proteína o canal no de la familia Na_v .

En una realización, se proporciona un método para determinar el efecto de una agente de unión a $Na_v1.7$ sobre un canal de DRG que no es un miembro de la familia Na_v , que comprende exponer DRG modificados a un agente de
30 unión a $Na_v1.7$, y medir una función de un canal de DRG no miembro de la familia Na_v .

En otro aspecto, se proporciona un método para determinar un efecto de un agente terapéutico humano sobre un $Na_v1.7$ humano, donde el agente terapéutico humano no se une a una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer un DRG modificado al agente terapéutico humano en un ensayo *ex vivo*, y medir un efecto del agente
35 terapéutico humano sobre una función de una proteína $Na_v1.7$ humana.

En diversas realizaciones y aspectos, se ensaya un DRG o DRG modificado o se determina una función de una proteína DRG o proteína DRG modificada en un protocolo de pinzamiento zonal, un protocolo de imágenes de calcio, un protocolo de colorante sensible a membrana, en un ensayo *ex vivo*.

40 En un aspecto, se proporciona un cultivo celular, donde el cultivo celular comprende una célula de un ratón modificado genéticamente como se describe en este documento, donde una cantidad sustancial de las células en el cultivo expresa una secuencia de $Na_v1.7$ humano. En una realización, las células que expresan la secuencia de $Na_v1.7$ humano se inmortalizan. En una realización, las células se obtienen de un tejido seleccionado entre cerebro
45 (incluyendo ganglios del bulbo olfatorio), tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente troncoencefálico, médula, colículo, núcleo óptico, corteza cerebral, materia gris de la médula espinal (por ejemplo, dorsal/sensorial), ganglios de la raíz dorsal, cadena de ganglios simpáticos, ganglios trigéminos, ganglio celiaco, plexo nervioso intestinal, y en ganglios más pequeños en todo el organismo (por ejemplo, lengua, esófago, tráquea, bronquios, corazón).

50 En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un agonista o antagonista putativo de $Na_v1.7$ se une a una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer el agonista o antagonista putativo de $Na_v1.7$ a una célula como se describe en este documento, y determinar si el agonista o antagonista putativo de $Na_v1.7$ se une a la célula.

En una realización, el agonista o antagonista de $Na_v1.7$ humano se selecciona entre una proteína, un péptido, y una molécula pequeña (por ejemplo, compuesto orgánico no proteico). En una realización específica, la proteína comprende un dominio variable de inmunoglobulina o fragmento de unión a $Na_v1.7$ de la misma. En una realización específica, la proteína es un anticuerpo anti- $Na_v1.7$ humano.

60 En un aspecto, se proporciona un método para determinar si una preparación farmacéutica afecta a una función de un $Na_v1.7$ humano, que comprende exponer la preparación farmacéutica a una célula proporcionada en este documento que expresa una proteína $Na_v1.7$ humana, y medir una función de $Na_v1.7$ de la célula.

En una realización, la función de $Na_v1.7$ medida es activación de nociceptores primarios. En una realización específica, la función medida es liberación de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) por la célula.

65

En una realización, la preparación farmacéutica comprende una proteína, un péptido, o un análogo peptídico. En una realización específica, la proteína comprende un dominio variable de inmunoglobulina o fragmento de unión a Na_v1.7 de la misma. En una realización específica, la proteína es un anticuerpo anti-Na_v1.7 humano.

5 En un aspecto, se proporciona un ensayo de aseguramiento de la calidad para una preparación farmacéutica que comprende un agente que se une a una secuencia de Na_v1.7 humano, que comprende obtener una muestra de una preparación farmacéutica y exponer la preparación a un ratón o una célula como se describe en este documento, donde el ratón o la célula expresa una secuencia de Na_v1.7 humano, y determinar (a) si la preparación farmacéutica se une a la célula, y/o (b) determinar si la preparación farmacéutica afecta a una función de Na_v1.7 de la célula.

10 En una realización, la preparación farmacéutica es un anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo. En una realización, la preparación farmacéutica es un bloqueante no anticuerpo de canales de iones o análogo del mismo.

15 Liberación de neuropéptido desde neuronas de ratones humanizados para Na_v1.7

Las neuronas nociceptivas primarias son susceptibles a varias técnicas de investigación bien establecidas, tales como registros de electrofisiología, imágenes de calcio y medición de liberación espontánea y estimulada de neuropéptido, que proporcionan ideas en funciones celulares y moleculares de neuronas individuales o subpoblaciones neuronales.

20 El péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), un péptido de 37 aminoácidos, se sintetiza y almacena predominantemente en neuronas sensoriales y puede liberarse tanto de axones centrales como periféricos (Poyner, D.R. 1992. Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol. Ther.* 56(1): 23-51). La liberación de CGRP desde terminales nerviosos sensoriales en tejidos periféricos desempeña un papel central en inflamación neurogénica mientras que la liberación desde terminales en el asta dorsal de la médula espinal modula la transmisión del dolor (Oku, R., M. Satoh, N. Fujii, A. Otaka, H. Yajima, y H. Takagi. 1987. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.* 403(2): 350-354). Ratones CGRP knock out muestran una respuesta atenuada a dolor químico es inflamación (Salmon, A., M.I. Damaj, L.M. Marubio, M.P. Epping-Jordan, E. Merlo-Pich, y J.P. Changeux. 2001. Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in α CGRP-deficient mice. *Nature Neuroscience* 4(4): 357-358), que implica CGRP en la regulación de la respuesta de dolor.

Varios mediadores inflamatorios, tales como prostaglandina E₂, bradicinina, y protones, u otros estimulantes tales como pH bajo, factores neurotróficos y capsaicina desempeñan un papel esencial en la inducción de dolor. Además, se sabe que los mediadores inflamatorios inducen la liberación de neuropéptidos mediante activación de receptores de membrana específicos. Por ejemplo, mediadores inflamatorios tales como prostaglandina E₂ y bradicinina excitan y sensibilizan neuronas DRG conduciendo a potenciales de acción que se bloquean por tetrodotoxina (Noda, K., Y. Ueda, K. Suzuki, y K. Yoda. 1997. Excitatory effects of algescic compounds on neuronal processes in murine dorsal root ganglion cell culture. *Brain Res.* 751 (2): 348-351; Nicol G.D. y M. Cui. 1994. Enhancement by prostaglandin E₂ of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurons. *Journal Physiol.* 480(Pt 3): 485-492; Momin A. y P.A. McNaughton. 2009. Regulation of firing frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Exp Brain Res.* 196(1): 45-52). Estos mediadores también ha demostrado regular la expresión de CGRP en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Supowit S.C., H. Zhao, K.A. Katki, P. Gupta, y D. J. Dipette 2011. Bradykinin and prostaglandin E₁ regulate calcitonin gene-related peptide expression in cultured rat sensory neurons. *Regul Pept.* 167(1): 105-111; Averbek, B., I. Lzydorczyk, y M. Kress. 2000. Inflammatory mediators release calcitonin gene-related peptide from dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neuroscience* 98(1): 135-140). Además, la prostaglandina E₂ potencia la liberación estimulada por bradicinina y capsaicina de CGRP (Vasko M.R., W. B. Campbell, y K. J. Waite. 1994. Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 14(8): 4987-4997; Southhall, M.D. y M. R. Vasko. 2001. Prostaglandin receptor subtypes EP3C and EP4 mediate the prostaglandin E₂-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 276: 16083-16091). La liberación de CGRP desde nervios estimulados se bloquea por al antagonista de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) y por omega conotoxina (CTX) pero no nifedipina, un bloqueante conocido de canales de calcio (Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, K. Alving, P. Delay-Goyet, e Y. Lou. 1992. Release of Calcitonin Gene-Related Peptide from Sensory Neurons. *Ann NY Acad. Sci.* 657:187-93). Estos últimos hallazgos sugieren que aunque los canales de calcio tipo N son importantes para la exocitosis de péptidos desde almacenes localizados en vesículas grandes de núcleo denso de aferentes primarios, los canales de sodio también desempeñan un papel en la liberación de CGRP. Se han demostrado características similares para la liberación de péptido provocada por bajas concentraciones de capsaicina, que también es sensible tanto a TTX como a CTX. Sin embargo, una alta concentración de capsaicina causa una liberación masiva de CGRP que solamente se inhibe de forma marginal, si lo hace, por TTX o CTX (Lou Y.P., A. Franco-Cereceda, y J. M. Lundberg. 1992. Different ion channel mechanisms between low concentrations of capsaicin and high concentrations of capsaicin and nicotine regarding peptide release from pulmonary afferents. *Acta Physiol. Scand.* 146(1): 119-127). Estos informes sugieren que la liberación de CGRP inducida por diferentes agentes inflamatorios es dependiente de diferentes canales/receptores y/o vías. Por tanto, la correcta estimulación para la interacción de receptores diana específicos que se saben asociados con respuestas de dolor puede identificarse a través de la medición de liberación de CGRP desde neuronas. Esto permite el análisis funcional específico de un receptor diana y el

descubrimiento del modo en que el receptor diana funciona en respuestas de dolor.

La despolarización de neuronas conduce a un aumento en la expresión y liberación de neuropéptido, en particular un aumento en la expresión de CGRP. La liberación de CGRP se ha usado en varios estudios para evaluar la mediación de la respuesta de dolor y la caracterización de la función neuronal incluyendo la generación de potenciales de acción con respecto a otros canales (aunque no canales de sodio). Como se ha descrito anteriormente, los mediadores inflamatorios, por ejemplo, bradicinina y prostaglandina E₂, han demostrado inducir la liberación de CGRP desde el ganglio de la raíz dorsal (DRG) en cultivo (Averbeck, B. et al., *supra*; Tumati, S., W. R. Roeske, T. W. Vanderah, y E. V. Varga. 2010. Sustained morphine treatment augments prostaglandin E₂-evoked calcitonin gene-related peptide release from primary sensory neurons in a PKA-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 648(1-3):95-101). Aunque la liberación de CGRP *in vitro* desde DRG ha revelado un papel esencial para los canales de calcio, la implicación en canales de sodio ha permanecido menos clara (Ai, X., S. E. MacPhedran, y A. K. Hall. 1998. Depolarization stimulates initial CGRP expression by embryonic sensory neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 18(22): 9294-9302; Strecker, T., K. Messlinger, M. Weyand, y P. W. Reeh. 2005. Role of different proton-sensitive channels in releasing calcitonin gene-related peptide from isolated hearts of mutant mice. *Cardiovasc. Res.* 65(2):405-410; Spitzer, M. J., P. W. Reeh, y S. K. Sauer. 2008. Mechanisms of potassium- and capsaicin-induced axonal calcitonin gene-related peptide release: involvement of L- and T-type calcium channels and TRPV1 but not sodium channels. *Neurosci.* 151(3):836-842). Por tanto, sigue existiendo una necesidad de desarrollar ensayos para evaluar la función neuronal mediada por canales de sodio, en particular a través de la aplicación de DRG que exprese una proteína Na_v1.7 humana.

Los métodos para la medición de la liberación de neuropéptido desde neuronas aisladas de ratones que expresan Na_v1.7 humana son útiles, por ejemplo, para dilucidar la función de neuronas nociceptivas que expresan una proteína Na_v1.7 humana en respuesta a mediadores inflamatorios mediante la medición de la liberación de CGRP. También son útiles para la identificación de antagonistas específicos de Na_v1.7 a través de la evaluación de su capacidad de alterar o modificar la liberación inducida por mediador inflamatorio de CGRP en DRG aislado de ratones que expresan una proteína Na_v1.7 humana.

Las neuronas DRG, que se sabe que expresan Na_v1.7, liberan CGRP tras despolarización. Esta propiedad de las neuronas DRG sugiere que los DRG que expresan Na_v1.7 humana pueden usarse en un ensayo como un medio para identificar antagonistas de Na_v1.7 usando medición de CGRP liberado de DRG aislados en cultivo. Por tanto, las neuronas (por ejemplo, neuronas DRG) que expresan un Na_v1.7 humano o un Na_v1.7 quimérico pueden emplearse en un ensayo para identificar antagonistas de Na_v1.7 que interactúan con canales Na_v1.7 humanos o quiméricos en neuronas DRG y evaluar la actividad funcional del canal a través de la medición de la liberación de CGRP. En dicho ensayo, por ejemplo, el Na_v1.7 humano o quimérico se incubaba con un inhibidor de Na_v1.7 (por ejemplo, tetrodotoxina) durante aproximadamente veinte minutos, seguido de estimulación con uno o más mediadores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandina E₂, bradicinina, y capsaicina) durante unos veinte minutos adicionales. Pueden emplearse antagonistas candidatos adicionales en este ensayo para evaluar su potencial terapéutico y capacidad de bloquear la función del canal Na_v1.7. Una vez determinadas las mediciones iniciales de liberación de CGRP desde las neuronas que expresan un Na_v1.7 humano o quimérico tanto en presencia de un inhibidor conocido de Na_v1.7 (por ejemplo, TTX) como en ausencia de un inhibidor conocido (es decir, mediadores inflamatorios solamente), puede determinarse fácilmente el aumento en la liberación de CGRP cuando se emplean antagonistas candidatos en este ensayo. Por tanto, es útil un ensayo adaptado para interactuar con una proteína de canal Na_v tal como Na_v1.7, por ejemplo, para la identificación de antagonistas específicos de Na_v1.7 a través de la evaluación de su capacidad para alterar o modificar el nivel de liberación de CGRP en DRG aislado de ratones que expresan una proteína Na_v1.7 humana que se expone a mediadores inflamatorios.

Se describen ensayos en este documento que miden la liberación de neuropéptido en células neuronales en respuesta a uno o más mediadores inflamatorios, que pueden usarse como ensayos funcionales para seleccionar antagonistas para un receptor diana. Específicamente, se describen ensayos en este documento que miden la liberación de CGRP desde DRG cultivados para la evaluación de la función de canales de sodio en presencia y ausencia de antagonistas específicos, en particular los DRG expresan una proteína Na_v1.7 humana, y que proporcionan nuevos métodos *in vitro* para la evaluación de activación de nociceptores primarios. En una realización, las neuronas DRG se ponen en contacto con uno o más mediadores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandina E₂, bradicinina y capsaicina, para interactuar específicamente con canales Na_v sensibles a TTX, específicamente Na_v1.7) y se determina la liberación de CGRP inducida por los mediadores inflamatorios.

Las neurotrofinas tales como GDNF, neurturina y artemina han demostrado potenciar la liberación inducida por capsaicina de CGRP (Schmutzler, B. S., S. Roy, y C. M. Hingtgen. 2009. Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands enhance capsaicin-stimulated release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. *Neurosci.* 161:148-156; Schmutzler, B. S., S. Roy, S. K. Pittman, R. M. Meadows, y C. M. Hingtgen. 2011. Ret-dependent and Ret-independent mechanisms of Gfl-induced sensitization. *Molecular Pain* 7:1-22). Las neurotrofinas preferentemente se unen a su propio receptor de la familia GDNF (GFRα₁, GFRα₂ y GFRα₃), y existe un 90 % de co-expresión de GFRα₃ con TRPV1, que también se conoce como el receptor de capsaicina. La capsaicina es un agonista de TRPV1 y casi todas las neuronas que expresan TRPV1 también expresan CGRP. La artemina sola no cambia el nivel basal de liberación de CGRP. Sin embargo, la pre-incubación con artemina durante diez minutos

antes de estimulación con capsaicina 1 μ M potencia significativamente la liberación de CGRP. Por tanto, puede emplearse un ensayo en que se incuban neuronas con artemina (por ejemplo, a 10 ng/ml) o GDNF (por ejemplo, a 10 ng/ml) durante diez minutos, seguido de estimulación con capsaicina durante diez minutos adicionales, para interactuar específicamente con GFR α 3 y evaluar la actividad funcional del receptor a través de la medición de la liberación de CGRP desde neuronas DRG *in vitro*. Además, el ensayo puede emplear antagonistas específicos de, por ejemplo, GFR α 3 para determinar su capacidad de bloquear la actividad y/o función del receptor.

El principio del ensayo puede adaptarse para otro receptor diana, por ejemplo, TRPA1. Se ha demostrado que el aceite de mostaza, un agonista específico de TRPA1, induce la liberación de CGRP desde piel de rata aislada de la pata trasera (Ruparel, N. B., A. M. Patwardhan, A. N. Akopian, y K. M. Hargreaves. 2008. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 135:271-279). Por tanto, podría usarse un ensayo en que se exponen neuronas DRG aisladas de un ratón como se describe en este documento, a aceite de mostaza, para interactuar específicamente con TRPA1 para que sirva como medio para evaluar funcionalmente la actividad de TRPA1 a través de la medición de la liberación de CGRP desde neuronas DRG *in vitro*. Además, podrían emplearse antagonistas específicos en el ensayo para determinar su capacidad de bloquear la actividad y/o función de TRPA1.

El principio del ensayo puede adaptarse para otros receptor diana más, por ejemplo, ASIC1 y/o ASIC3. ASIC1 y ASIC3 son canales catiónicos abiertos por protones que se activan por variaciones externas de pH que varían entre pH 6,8 a 4,0. Se ha demostrado que el pH bajo desencadena la liberación de CGRP. Por tanto, podría usarse un ensayo en que se exponen neuronas DRG aisladas de un ratón como se describe en este documento, a condiciones de pH bajo, en cultivo, para interactuar específicamente con ASIC1 (o ASIC3) para que sirva como medio para evaluar funcionalmente la actividad de ASIC1 (o ASIC3) a través de la medición de la liberación de CGRP desde neuronas DRG *in vitro*. Además, podrían emplearse antagonistas específicos en el ensayo para determinar su capacidad de bloquear la actividad y/o función de ASIC1 (o ASIC3).

En un aspecto, se proporciona un método para medir la actividad de un receptor diana, que comprende poner en contacto un mediador inflamatorio con una célula que tiene un receptor diana codificado por un gen de ratón humanizado, donde el mediador inflamatorio se une al receptor diana, y determinar la liberación mediada por el receptor diana de neuropéptido desde la célula. En una realización, el mediador inflamatorio es un ligando de Na_v1.7, y el receptor diana es un Na_v1.7 de ratón humanizado.

En un aspecto, se proporciona un método para la interacción selectiva de un receptor diana, que comprende poner en contacto una célula aislada de un ratón como se describe en este documento con uno o más mediadores inflamatorios, interactuando selectivamente de ese modo con el receptor diana y determinando la liberación de un neuropéptido desde la célula aislada.

En una realización, el receptor diana es un canal de sodio. En una realización específica, el canal de sodio es Na_v1.7.

En una realización, la célula es una célula neuronal. En una realización específica, la célula neuronal es una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG). En una realización, la célula es una célula inmortalizada.

En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre prostaglandina E₂, bradicinina, capsaicina, protones, pH bajo, un factor neurotrófico y una combinación de los mismos.

En una realización, el neuropéptido es péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP).

En una realización, el método se emplea como un ensayo funcional para seleccionar un antagonista para el receptor diana.

En una realización, se proporciona un método para la interacción selectiva de una proteína Na_v1.7 en la superficie de un DRG aislado de un ratón como se describe en este documento, que comprende poner en contacto el DRG con uno o más mediadores inflamatorios estimulando selectivamente de ese modo Na_v1.7 y determinando la liberación de CGRP.

En una realización, el uno o más mediadores inflamatorios comprenden prostaglandina E₂, bradicinina y capsaicina.

En una realización, el método se emplea como un ensayo funcional para seleccionar un antagonista para Na_v1.7. En una realización específica, el antagonista es un anticuerpo.

En un aspecto, se proporciona un método para medir la liberación de CGRP desde un DRG aislado de un ratón como se describe en este documento, en particular para determinar el efecto de un antagonista específico de Na_v sobre la liberación de CGRP asociada con la despolarización de una proteína de canal Na_v1.7 humano, en particular a través de la estimulación con uno o más mediadores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandina E₂, bradicinina, serotonina, histamina y capsaicina).

En una realización, el DRG está inmortalizado.

En una realización, el antagonista específico de Na_v se selecciona entre una proteína, una molécula pequeña, y un ARN interferente pequeño (ARNip). En una realización específica, el antagonista específico de Na_v es una proteína.

En una realización, se cultiva un DRG aislado de un ratón como se describe en este documento en presencia de una toxina específica de Na_v y, después de un periodo posterior de tiempo, se determina la liberación de CGRP, donde un nivel elevado de expresión de CGRP indica inhibición de función específica de Na_v en la célula DRG. La identidad del antagonista específico de Na_v es conocida antes del cultivo con el DRG y el DRG se analiza para el nivel basal de expresión de CGRP en presencia y ausencia del uno o más mediadores inflamatorios.

En una realización, la toxina específica de Na_v se selecciona entre tetrodotoxina (TTX), ProTx-II, y lidocaína. En una realización específica, la toxina específica de Na_v es TTX.

En una realización, se cultiva un DRG aislado de un ratón como se describe en este documento en presencia de un anticuerpo específico para $Na_v1.7$, y se determina la liberación de CGRP, donde un nivel elevado de expresión de CGRP indica inhibición de función de $Na_v1.7$ en la célula DRG. La identidad y perfil bioquímico (por ejemplo, afinidad, especificidad, etc.) del anticuerpo específico para $Na_v1.7$ son conocidos antes del cultivo con el DRG y el DRG se analiza para el nivel basal de expresión de CGRP en presencia y ausencia del uno o más mediadores inflamatorios.

En una realización, el anticuerpo específico de $Na_v1.7$ es un anticuerpo humano. En una realización, el anticuerpo específico de $Na_v1.7$ es un anticuerpo de ratón. En una realización, el anticuerpo específico de $Na_v1.7$ es un anticuerpo biespecífico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los especialistas en la técnica el modo de preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de los que los inventores consideran como su invención. Salvo que se indique de otro modo, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es o cerca de atmosférica.

Ejemplo I

Deleción de un locus de $Na_v1.7$ endógeno

Se preparó el vector de direccionamiento para introducir una deleción del gen de $Na_v1.7$ endógeno usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.586.251 y Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Frendewey, D., Gale, N.W., Economides, A.N., Auerbach, W., Poueymirou, W.T., Adams, N.C., Rojas, J., Yasenchak, J., Chernomorsky, R., Boucher, M., Elsasser, A.L., Esau, L., Zheng, J., Griffiths, J.A., Wang, X., Su, H., Xue, Y., Dominguez, M.G., Noguera, I., Torres, R., Macdonald, L.E., Stewart, A.F., DeChiara, T.M., Yancopoulos, G.D. 2003, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nature Biotech. 21(6): 652-659) para modificar el cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-454H3 (Invitrogen). Se modificó el ADN de BAC RP23-454H3 para deleccionar el gen de $Na_v1.7$ endógeno que comprende la subunidad- α del gen de este canal Na_v que se expresa en la superficie celular (FIG. 2).

En resumen, se obtuvieron brazos de homología cadena arriba y cadena abajo del ADN de BAC de ratón a partir de las localizaciones 5' del exón 6 y 3' del exón 28 del locus de $Na_v1.7$ endógeno, respectivamente. Estos brazos de homología se usaron para preparar un casete que deleccionó ~81 kb del locus de $Na_v1.7$ endógeno que comprende los exones 6 a 28. Esta región se reemplazó con un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP (FIG. 2, centro). El vector de direccionamiento final desde 5' a 3' incluía un brazo de homología de 17 kb que comprendía la secuencia genómica de ratón 5' al exón 6 del locus de $Na_v1.7$ endógeno, un sitio loxP 5', un casete de neomicina, un sitio loxP 3' y un brazo de homología de 29 kb que comprendía la secuencia genómica de ratón 3' al exón 28 del locus de $Na_v1.7$ endógeno. El vector de direccionamiento se linealizó por digestión con AgeI y después se usó en recombinación homóloga en células bacterianas que contenían el clon de BAC de ratón RP23-454h3 para conseguir una deleción dirigida del locus de $Na_v1.7$ endógeno (FIG. 2, parte inferior).

El ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprendían una deleción del locus de $Na_v1.7$ endógeno. Se identificaron células ES positivas que contenían un locus de $Na_v1.7$ endógeno delecionado por el ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN® (Lie, Y. S. y C. J. Petropoulos. 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9: 43-48). La región cadena arriba del locus delecionado se confirmó por PCR usando los cebadores 867TUP2F (GGGACTTCTC TGGGTTTCAGT TA; SEC ID N° 1) y 867TUP2R (AAAGGCTCTC AATGGGAAAC AAG; SEC ID N° 2) y la sonda 867TUP2P (TCAATGACTT GACATAATGC ATGCACTCC; SEC ID N° 3), mientras que la región cadena abajo del locus delecionado se confirmó usando los cebadores 867TDPF (ATGTCAGCCA ATCCTTCTAA AGTG; SEC ID N°4) y 867TDPR (CGTTTTGCCT AAGGCGGTAC; SEC ID N°5) y la sonda 867TDPP (TCCTATGAGC CCATCACAAAC CACAC; SEC ID N° 6). La

presencia del casete de neomicina del vector de direccionamiento se confirmó usando los cebadores NEOF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; SEC ID N°7) y NEOR (GAACACGGCG GCATCAG; SEC ID N° 8) y la sonda NEOP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEC ID N° 9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de delección cadena arriba incluía lo siguiente, que indica secuencia de ratón endógena cadena arriba del punto de delección (contenido dentro del paréntesis a continuación) ligada de forma contigua a la secuencia de casete presente en el punto de delección: (CTAGCTGAGC TGTCACCACA CATTGCTCCT ACCACGTATT GTACAGCTAC TGCAAGAGCA CCACAGTTGG CTTTCTGTAT C) ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT (SEC ID N° 10). La secuencia de nucleótidos a través del punto de delección cadena abajo incluía lo siguiente, que indica la secuencia de casete contigua con secuencia de ratón endógena cadena abajo del punto de delección (contenido dentro del paréntesis a continuación): ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT (AGCTTCGGTT TTGATACACT GTTTACAGCC TGCGAAGGTG ACTCACTCGT GTTAATAAGA CTCTTTTACG GAGGTCTATG CCAAACCTCT TTTATCAAAT ATTCTCAAAG GCAG) (SEC ID N° 11). Después se usaron los clones de células ES positivos para implantar ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una cama de crías que contenían una delección del locus de Na_v1.7 endógeno.

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células por el método de VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 7.294.754 y Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Friendewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela, D.M. 2007. F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nature Biotech.* 25(1): 91-99). Se identificaron ratones que albergaban una delección de los exones 6 a 28 en el locus de Na_v1.7 endógeno por genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia del casete de neomicina y confirmó la ausencia de secuencias de Na_v1.7 endógenas.

Los ratones que albergan una delección de los exones 6 a 28 en el locus de Na_v1.7 endógeno pueden cruzarse con una cepa de ratón Cre deleter (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2009/114400) para retirar cualquier casete de neomicina entre lox introducido por el vector de direccionamiento que no está retirado, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina se retiene en los ratones.

Las crías se genotipan y se selecciona una cría heterocigótica para las secuencias de Na_v1.7 endógenas delecionadas para caracterizar la delección de Na_v1.7 endógeno.

Ejemplo II

Humanización de un locus de Na_v1.7 endógeno

Se construyó un vector de direccionamiento para el remplazo del locus de Na_v1.7 endógeno con el locus de Na_v1.7 humano (FIG. 3) usando un proceso de dos etapas que implica el ligamiento de ADN de BAC y la reparación de los huecos (Zhang, Y., J. P. P. Muyrers, G. Testa, y F. A. Stewart. 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 18:1314-1317; Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. P. Muyrers, y F. A. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* 20:123-128).

La primera etapa en la construcción del vector de direccionamiento de remplazo se realizó por ligamiento de un fragmento de ADN del clon de ADN de BAC de ratón RP23-454H3 con un fragmento de ADN humano del clon de BAC humano RP11-1002M1 (Invitrogen). Este ligamiento de fragmentos de ADN de BAC de ratón y humano creó un clon BAC modificado que contenía un remplazo de los exones 5 a 28 del locus de Na_v1.7 de ratón (aproximadamente 81 kb) con los exones 5 a 28 del locus de Na_v1.7 humano (aproximadamente 100 kb).

La segunda etapa en la construcción del vector de direccionamiento de remplazo se realizó por reparación de huecos (mencionado anteriormente) usando el clon de BAC de ratón RP23-454H3 y el clon de BAC humano RP11-45AJ20 para añadir exones adicionales del locus de Na_v1.7 humano al clon BAC modificado preparado en la primera etapa. La reparación de huecos se realizó usando estos clones de BAC de ratón y humano para reemplazar los exones 2 a 7 del locus de Na_v1.7 endógeno con los exones 2 a 7 del locus de Na_v1.7 humano (~13 kb). Esta segunda etapa añadió las ~13 kb de la secuencia de Na_v1.7 humano a las ~100 kb de la secuencia de Na_v1.7 humana para hacer el remplazo del locus de Na_v1.7 endógeno. Se añadió un casete de higromicina flanqueado por sitios loxP al extremo 3' del fragmento de BAC de ~113 kb que contenía el locus de Na_v1.7 humano (FIG. 3, centro)

Se obtuvieron los brazos de homología cadena arriba y cadena debajo de ADN de BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' del locus de Na_v1.7 endógeno para su adición al fragmento de ADN humano-casete de higromicina para crear el vector de direccionamiento final para el remplazo del locus de Na_v1.7 endógeno que contenían de 5' a 3' un brazo de homología 5' que contenía 70 kb del ADN de ratón 5' del locus de Na_v1.7 endógeno, un fragmento de ADN de ~113 kb que contenía los exones 2 a 28 del locus de Na_v1.7 humano, un casete de higromicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología 3' que contenía 147 kb del ADN de ratón 3' del locus de Na_v1.7 endógeno. El vector de direccionamiento se linealizó por digestión con NotI y después se usó en recombinación homóloga en células

bacterianas para conseguir un remplazo dirigido del locus de $Na_v1.7$ endógeno con los exones 2 a 28 del locus de $Na_v1.7$ humano (FIG. 3, parte inferior).

5 El ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprendían un remplazo del locus de $Na_v1.7$ de ratón endógeno con un fragmento genómico que comprendía un locus de $Na_v1.7$ humano. Las células ES positivas que contenían un locus de $Na_v1.7$ endógeno delecionado remplazado por un fragmento genómico que comprendía un locus de $Na_v1.7$ humano se identificaron por un ensayo de PCR cuantitativa usando sondas Taqman® (Lie y Petropoulos, *supra*). Las regiones cadena arriba y cadena abajo fuera del locus modificado se confirmaron por PCR usando los mismos cebadores y sondas que los descritos en el Ejemplo 1 (867TUP2F/867TUP2R/867TUP2P y 867TDPF/867TDPR/867TDPP). La inserción de la secuencia de $Na_v1.7$ humano se confirmó por PCR usando los cebadores 935HF (ATCAAAGGAA CCAAAGAAG; SEC ID N° 12) y 935HR (GAAGGGCAGC TGTTTGCCAG; SEC ID N° 13) y la sonda 935HP (ATGAAGAAGC CCAAAGCCA AGCA; SEC ID N° 14). La presencia del casete de higromicina del vector de direccionamiento se confirmó con los cebadores HYG F (TGCGGCCGATCTTAGCC; SEC ID N° 15) y HYG R (TTGACCGATTCTTGCGG; SEC ID N° 16) y la sonda HYG P (ACGAGCGGGTTGCGCCCATTC; SEC ID N° 17). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluía lo siguiente, que indica la secuencia de ratón endógena cadena arriba del punto de inserción (contenido dentro de paréntesis a continuación) ligada de forma contigua a la secuencia genómica de $Na_v1.7$ humano presente en el punto de inserción: (TTAGGTAAGG ATCCGAAGGG GAAATAAAAC CTACAGGATG AGAAG) ATGGCAATGT TGCCTCCCC AGGACCTCAG AGCTTTGTCC ATTTACAAA ACAG (SEC ID N° 18). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 5' del casete de higromicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica de $Na_v1.7$ humano contigua con la secuencia del casete cadena abajo del punto de inserción (contenido dentro del paréntesis a continuación): GTATGAATAA AAAAGCATTG AATAGGGAT TCTTGCCAAC TTGCTC (TCTCGAGATA ACTTCGTATA ATGTATGCTA TACGAAGTTA T) (SEC ID N° 19). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' del casete de higromicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón en el extremo 3' del locus de $Na_v1.7$ endógeno (contenido dentro del paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGTA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGAGCTAG (CAGCTTCGGT TTTGATACAC TGTTACAGC CTGCGAAGGT G) (SEC ID N° 20). Los clones de células ES positivos después se usaron para implantar ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (*supra*) para generar una camada de crías que contenían un remplazo del locus de $Na_v1.7$ endógeno con un locus de $Na_v1.7$ humano.

35 Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (*supra*). Los ratones que albergaban un locus de $Na_v1.7$ humano se identificaron por genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de un locus de $Na_v1.7$ humano.

40 Los ratones que albergaban un locus de $Na_v1.7$ humano pueden cruzarse con una cepa de ratón Cre deleter (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2009/114400) para retirar cualquier casete de higromicina entre lox introducido por el vector de direccionamiento que no se retiró, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina se retiene en los ratones.

45 Las crías se genotipan y se selecciona un cría heterocigótica para un locus de $Na_v1.7$ humano para caracterizan la humanización de $Na_v1.7$.

Ejemplo III

Humanización del bucle extracelular de los segmentos transmembrana 5 a 6 en el dominio I de un locus de $Na_v1.7$ endógeno

50 Se construyó un vector de direccionamiento para la humanización del bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I (DI/S5-S6) por el método de reparación de huecos (descrito anteriormente) usando el clon de BAC de ratón RP23-20C24 y el clon de BAC humano RP11-45AJ20 (FIG. 4). El método de reparación de huecos se usó para remplazar un fragmento de ADN de 13,8 kb que contenía los exones 7 a 9 del locus de $Na_v1.7$ endógeno con un fragmento de ADN de 10 kb que contenía los exones 7 a 9 del locus de $Na_v1.7$ humano. Se añadió un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP al extremo del fragmento de ADN humano de 10 kb que contenía los exones 7 a 9 del locus de $Na_v1.7$ humano (FIG. 4, centro).

60 Los brazos de homología cadena arriba y cadena abajo se obtuvieron del ADN de BAC de ratón en posiciones 5' y 3' de los exones 7 y 9, respectivamente, y se añadieron al fragmento humano de 10 kb-casete de neomicina para crear el vector de direccionamiento final para la humanización del bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio I del locus de $Na_v1.7$ endógeno que contenía de 5' a 3' un brazo de homología 5' que contenía 35 kb de ADN de ratón 5' del exón 7 del locus de $Na_v1.7$ endógeno, un fragmento de ADN de 10 kb que contenía los exones 7 a 9 del locus de $Na_v1.7$ humano, un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología 3' que contenía 27 kb de ADN de ratón 3' del exón 9 del locus de $Na_v1.7$ endógeno. El vector de direccionamiento se linealizó por digestión con PspX y Sall y después se usó en recombinación homóloga en células

bacterianas para conseguir un remplazo dirigido de los exones 7 a 9 en el locus de Na_v1.7 endógeno con los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano (FIG. 4, parte inferior).

El ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprendían un remplazo de los exones 7 a 9 en el locus de Na_v1.7 de ratón endógeno con un fragmento genómico que comprendía los exones 7 a 9 de un locus de Na_v1.7 humano. Las células ES positivas que contenían un fragmento genómico que comprendía los exones 7 a 9 de un gen de Na_v1.7 humano se identificaron por ensayo de PCR cuantitativa usando sondas Taqman® (Lie y Petropoulos, *supra*). La región cadena arriba fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó por PCR usando los cebadores 869TUPF (GGACTACAAC TGTTTATGGG CAAC; SEC ID N° 21) y 869TUPR (TCAATTCTTC TTCACTCTCA GCAG; SEC ID N° 22) y la sonda 869TUPP (TCCGGAAGGA CCTTGAGCAG AATGA; SEC ID N° 23), mientras que la región cadena abajo fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó con los cebadores 869TDPF (CAACAGGTGA GCAGCAACAG; SEC ID N° 24) y 869TDPR (GCAGGAGACA CATAACCAG AC; SEC ID N° 25) y la sonda 869TDPP (AAACACGCAT GTCTGAAGGC AGTCGG; SEC ID N° 26). La presencia del casete de neomicina del vector de direccionamiento se confirmó usando los mismos cebadores y sonda descritos en el Ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluía lo siguiente, que indica la secuencia de ratón endógena cadena arriba del punto de inserción (contenido dentro del paréntesis a continuación) ligada de forma contigua a la secuencia genómica de Na_v1.7 humano presente en el punto de inserción: (TACATTTTAA GGACTAAAAA CCATCGTGGG GGCCCTGATC CAATCAGTGA AGAAGCTCTC TGACGTCATG ATCCTCACTG TGTTCTGTCT CAGTGTGTTT) GCACTAATTG GACTACAGCT GTTCATGGGA AACCTGAAGC ATAAATGTTT TCGAAATTCA CTTGAAAATA ATGAAACATT AGAAAGCATA ATGAATACCC T (SEC ID N° 27). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 5' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica de Na_v1.7 humano contigua con la secuencia de casete cada abajo del punto de inserción (contenido dentro del paréntesis a continuación): AGGTGAGTAC CAAGAGAAAC ATGCATTGTA TTTTGAATG GCATATGTAC CTGGTGTATG TTAAGAGCCT GTATTAGGAG GTTTTTTATT TATTTGAGAA TGGAGGAAAC TCTATTA (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT) (SEC ID N° 28). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia de casete contigua con la secuencia genómica de ratón 3' del exón 9 del locus de Na_v1.7 endógeno (contenido dentro del paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGC (TCTGCAGACA GTCTGGGACT CCCTAATGTG CATTATTAATA ATTACAGGCA ATTTACTTGG CTGATATGAG AACAGATAGT TCTGAAGTCA TCAATAATTT TCTGCTGTGT CTGACCAGCG TT) (SEC ID N° 29). Los clones de células ES positivas después se usaron para implantar ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contenían un remplazo de los exones 7 a 9 del locus de Na_v1.7 endógeno con los correspondientes exones del locus de Na_v1.7 humano.

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (*supra*). Los ratones que albergaban la humanización de los exones 7 a 9 del locus de Na_v1.7 endógeno se identificaron por genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de las secuencias de Na_v1.7 humano.

Los ratones que albergan el DI/S5-S6 humanizado en el locus de Na_v1.7 endógeno puede cruzarse con una cepa de ratón Cre deletor (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2009/114400) para retirar cualquier casete de neomicina entre lox introducido por el vector de direccionamiento que no está retirado, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de neomicina se retiene en los ratones.

Las crías se genotipan y se selecciona una cría heterocigótica para el DI/S5-S6 humanizado en el locus de Na_v1.7 endógeno para caracterizar la humanización de Na_v1.7 DI/S5-S6.

Ejemplo IV

Humanización del bucle extracelular de los segmentos transmembrana 5 a 6 en el dominio III de un locus de Na_v1.7 endógeno

Se construyó un vector de direccionamiento para la humanización del bucle de poro extracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6 del dominio III (DIII/S5-S6) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el clon de ratón BMQ-311E20 y el clon de BAC humano RP11-746P5 (FIG. 5). Se amplificaron los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 a partir del clon de BAC humano RP11-746P5. Se ligó un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP al extremo 3' del fragmento de PCR de 2,8 kb (FIG. 5, centro). Este fragmento de ADN ligado que contenía los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 humano y el casete de neomicina se usó para reemplazar una sección de 2,4 kb del locus de Na_v1.7 de ratón endógeno que contenía los exones 23 a 25 en el clon de BAC de ratón BMQ-311E20 (FIG. 5).

Los brazos de homología cadena arriba y cadena abajo se obtuvieron de ADN de BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' de los exones 23 y 25, respectivamente, y se añadieron al fragmento de ADN humano-casete de neomicina para crear el vector de direccionamiento final para la humanización de DIII/S5-S6 del locus de Na_v1.7 endógeno que

5 contenía de 5' a 3' un brazo de homología 5' que contenía 21 kb de ADN de ratón 5' del exón 23 del locus de Na_v1.7 endógeno, un fragmento de ADN de 2,8 kb que contenía los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 humano, un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología 3' que contenía 108 kb de ADN de ratón 3' del exón 25 del locus de Na_v1.7 endógeno. El vector de direccionamiento se linealizó por digestión con NotI y después se usó en recombinación homóloga en células bacterianas para conseguir un remplazo dirigido de los exones 23 a 25 en el locus de Na_v1.7 endógeno con los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 humano (FIG. 5, parte inferior).

10 El ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprendían un remplazo de los exones 23 a 25 en el locus de Na_v1.7 de ratón endógeno con un fragmento genómico que comprendía los exones 23 a 25 de un locus de Na_v1.7 humano. Las células ES positivas que contenían un fragmento genómico que comprendía los exones 23 a 25 de un gen de Na_v1.7 humano se identificaron por el ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN® (Lie y Petropoulos, *supra*). La región cadena arriba fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó por PCR usando los cebadores 892TUPF (GCTTGGGCTT GCACCTTTA; SEC ID N° 30) y 892TUPR (TGCGTTGACC ACTACCTGAT AC; SEC ID N° 31) y la sonda 892TUPP (TCTGCATTGG CGTCTGTTG TCA; SEC ID N° 32), mientras que la región cadena abajo fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó con los cebadores 892TDP3F (TGACTTGCCC TATCAATCTG AGATC; SEC ID N° 33) y 892TDP3R (GCTCACACTG TATACACACA AAATCTTC; SEC ID N° 34) y la sonda 892TDP3P (TCACTGCCTA TGATAAAGT; SEC ID N° 35). La presencia del casete de neomicina del vector de direccionamiento se confirmó usando los mismos cebadores y sonda descritos en el Ejemplo 1. La inserción de los exones 23 a 25 del gen de Na_v1.7 humano se confirmó por PCR usando los cebadores 892HF (CACGGTTTCC TGCAAGTCAA; SEC ID N° 36) y 892HR (GGGACACTTA CAACTTGAAG CA; SEC ID N° 37) y la sonda 892HP (TCGTTCCGAA TGTTTGGCCC TTATGA; SEC ID N° 38). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica de ratón cadena arriba del exón 23 del locus de Na_v1.7 endógeno (contenido dentro del paréntesis a continuación) ligada de forma contigua a la secuencia genómica de Na_v1.7 humano presente en el punto de inserción: (TTTCATTTAT TTGAAGTGCA ATATCATCTT GGCCATCTAC TCCTCTGTAT GCTAGTAG) GTAAGCCTGG TGATCACAGA (SEC ID N° 39). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 5' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica de Na_v1.7 humano contigua con la secuencia de casete cadena abajo del punto de inserción (contenido dentro del paréntesis a continuación): GACTAGTATA CAATTACAAA TATGC (CTCGAGATAA CTTCTGATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT) (SEC ID N° 40). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia de casete contigua con la secuencia genómica de ratón 3' del exón 25 del locus de Na_v1.7 endógeno (contenido dentro del paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGC (TTTCCTGCTA ACCATCATTG TGGGGTATGT GTTATGATGG AAGTTAAGTG ACAGTTACTT ATAATATGGC TGCT) (SEC ID N° 41). Los clones de células ES positivas después se usaron para implantar ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contenían un remplazo de los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 endógeno con los correspondientes exones del locus de Na_v1.7 humano.

40 Los ratones que contenían una humanización de los exones 23 a 25 en el locus de Na_v1.7 endógeno con el vector de direccionamiento de Na_v1.7-DIII/S5-S6 humano se generaron a través de electroporación de un ADN de BAC dirigido (descrito anteriormente) en células ES de ratón. Los clones de células ES positivas se confirmaron por selección Taqman™ y cariotipado. Los clones de células ES positivas después se usaron para implantar ratones hembra usando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contenían una humanización de los exones 23 a 25 en el locus de Na_v1.7 endógeno.

50 Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 7.294.754 y Poueymirou et al., *supra*). Los ratones que albergaban la humanización de los exones 23 a 25 del locus de Na_v1.7 endógeno se identificaron por genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de las secuencias de Na_v1.7 humano.

55 Los ratones que albergaban el DIII/S5-S6 humanizado en el locus de Na_v1.7 endógeno pueden cruzarse con una cepa de ratón Cre deletor (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2009/114400) para retirar cualquier casete de neomicina entre lox introducido por el vector de direccionamiento que no está retirado, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de neomicina se retiene en los ratones.

60 Las crías se genotipan y se selecciona una cría heterocigótica para el DIII/S5-S6 humanizado en el locus de Na_v1.7 endógeno para caracterizar la humanización de Na_v1.7 DIII/S5-S6.

Ejemplo V

Fenotipado de comportamiento de ratones con Na_v1.7 humanizado

65

Los actuales métodos para estudiar los efectos de manipulación farmacológica de Na_v1.7 humano dependen de células transfectadas que se cultivan *in vitro*. Estas células que se modifican por ingeniería para expresar proteína Na_v1.7 humana carecen de proteínas auxiliares y podrían no ser completamente representativas de los mecanismos por los cuales dicho Na_v1.7 humano funciona *in vivo*. Por tanto, se generaron ratones modificados por ingeniería para expresar Na_v1.7 humano o un Na_v1.7 quimérico que tenía un bucle de poro extracelular humanizado como se describe en los Ejemplos 2 - 4 y se analizaron para comprender la función de Na_v1.7 *in vivo*.

En resumen, se sometieron dos grupos (n=6/6 cada uno; machos/hembras a las 10-20 semanas) de ratones, de tipo silvestre (*Scn9a*^{+/+}) y ratones heterocigóticos para un remplazo de un gen de Na_v1.7 de ratón con un gen de Na_v1.7 humano (*Scn9a*^{hum/+}), cada uno a varios estímulos nocifensivos (térmico con placa caliente, térmico de golpe en la cola y presión mecánica nociva). Los resultados se muestran en las FIG. 6A - 6C.

En un experimento similar, se sometieron dos grupos (n=10 cada uno; hembras a las 10-20 semanas) de ratones, de tipo silvestre (*Scn9a*^{+/+}) y ratones homocigóticos para un gen de Na_v1.7 quimérico que contiene una secuencia humana que codifica un bucle de poro extracelular (DI/S5-S6; *Scn9a*^{3.1/3.1}), cada uno a varios estímulos nocifensivos (térmico con placa caliente, térmico de golpe en la cola, mecánico nocivo, e hipernocicepción inflamatoria usando adyuvante completo de Freund). Los resultados se muestran en las FIG. 7A - 7D.

No se observó diferencia significativa en ninguno de los criterios de valoración agudos entre ratones *Scn9a*^{+/+} y *Scn9a*^{hum/+} o *Scn9a*^{+/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Estos resultados demuestran que ratones humanizados que contienen un gen de Na_v1.7 humano de longitud completa en lugar del gen endógeno (como se describe en el Ejemplo 2) o una secuencia humana que codifica un bucle de poro extracelular (como se describe en el Ejemplo 3) presentan comportamientos nociceptivos normales en respuesta a estímulos nocifensivos en comparación con ratones de control de tipo silvestre.

Como se muestra en este Ejemplo, los ratones modificados por ingeniería para expresar proteína Na_v1.7 completa o parcialmente humana sobre la superficie de neuronas responden a estímulos nociceptivos de un modo similar en comparación con el tipo silvestre y por tanto proporcionan una plataforma para identificar antagonistas de la subunidad-α de Na_v1.7 y/o un bucle de poro extracelular particular. Dichos antagonistas pueden ser útiles en el bloqueo de funciones específicas y actividades neuronales asociadas en el tratamiento de varios síndromes clínicos de dolor.

Ejemplo VI

Identificación y función de DRG en ratones con Na_v1.7 humanizado

Se generaron y analizaron anticuerpos humanos específicos para Na_v1.7 humano para la unión a células neuronales aisladas de los ratones con Na_v1.7 humanizado descritos en los Ejemplos 2 - 4.

En resumen, a ratones VELOCIMMUNE® (documento U.S. 6.596.541) se les administró antígeno Na_v1.7 humano (hNa_v1.7) con adyuvante (por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund, sistema adyuvante MPL+TDM (Sigma), o RIBI (muramil dipéptidos) (véase O'Hagan 2000 Vaccine Adjuvant, por Human Press, Totowa, NJ)). Se controló la respuesta inmune y se aislaron anticuerpos que contenían regiones variables humanas y regiones constantes de ratón de líneas celulares de hibridoma creadas a partir de células B que expresaban anticuerpos recogidas de ratones inmunizados. Como alternativa, pueden aislarse células de hibridoma específicas de antígeno por citometría de flujo. Los anticuerpos específicos para hNa_v1.7 también pueden identificarse mediante aislamiento directo de esplenocitos (por ejemplo, véase el documento U.S. 7.582.298). Se obtuvieron varios anticuerpos anti-hNa_v1.7 por los métodos anteriores y se usaron células HEK293 modificadas por ingeniería para expresar de forma estable Na_v1.7 humano o Na_v1.5 humano para identificar anticuerpos que se unieran específicamente a Na_v1.7 pero no a Na_v1.5 determinado por citometría de flujo.

Se ensayaron anticuerpos anti-hNa_v1.7 seleccionados para determinar su capacidad de bloquear la función electrofisiológica (por ejemplo, corriente, flujo de iones, etc.) del canal Na_v1.7 usando el sistema IONWORKS QUATTRO™ (IWQ, Molecular Devices), el sistema Port-a-Patch® (Nanion Technologies) y el sistema QPatch (Sophion Bioscience). La Tabla 1 expone el porcentaje promedio de inhibición para cinco anticuerpos anti-hNa_v1.7 seleccionados: menos del 15 % (-), el 15-30 % (+), más del 30 % (++) . nd: no determinado.

Tabla 1

Anticuerpo	IWQ (222 nM)	Port-a-Patch (50 nM)	QPatch (100 nM)
Ab1	++	++	+
Ab2	++	nd	+
Ab3	++	++	+
Ab4	++	+	+
Ab5	-	+	+

Inmunohistoquímica. El procesamiento del dolor es el resultado de complejas interacciones entre varias proteínas, receptores y canales que se expresan en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Se evaluaron anticuerpos anti-hNav_v1.7 seleccionados para la unión a neuronas DRG recogidas de ratones modificados por ingeniería para expresar Nav_v1.7 humano (*Scn9a^{hum/+}*, Ejemplo 2), ratones modificados por ingeniería para expresar un Nav_v1.7 quimérico que contenía un bucle de poro extracelular humano (*Scn9a^{3.1/3.1}*, Ejemplo 3) y ratones de tipo silvestre (*Scn9a^{+/+}*).

En resumen, se disociaron DRG lumbares recogidos de ratones *Scn9a^{hum/+}*, *Scn9a^{3.1/3.1}* y *Scn9a^{+/+}* y ratas *Scn9a^{+/+}* (*rScn9a^{+/+}*) y se sembraron en placa a una densidad de 5,5x10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos tratadas con poli-DL-ornitina (0,1 mg/ml) y laminina (5 µg/ml) seguido de incubación a 37 °C en 96,5 % de aire y 3,5 % de CO₂. Las neuronas se mantuvieron en cultivo durante de 3 a 8 días en DMEM suplementado con 50 ng/ml de factor de crecimiento de nervios, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, vitaminas MEM, y suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 %. Las células sembradas después se fijaron en PFA al 4 % y sacarosa al 4 % en PBS pH 7,2 durante 30 minutos. Las células después se lavaron en PBS seguido de bloqueo en suero de cabra normal al 20 % durante una hora a temperatura ambiente. Después las neuronas se permeabilizaron en suero de cabra normal al 10 % con Triton X-100 al 0,1 % antes de inmunotinción para confirmar la actividad de unión a un Nav_v1.7 humano o quimérico (o de ratón y/o rata) sobre la superficie celular de las neuronas DRG. La Tabla 2 expone la unión específica de especie (+) o ausencia de unión (-) a neuronas DRG para anticuerpos anti-Nav_v1.7 seleccionados.

Tabla 2

Anticuerpo	Genotipo DRG			
	<i>Scn9a^{hum/+}</i>	<i>Scn9a^{3.1/3.1}</i>	<i>Scn9a^{+/+}</i>	<i>rScn9a^{+/+}</i>
Ab1	-		-	-
Ab2			+	-
Ab3	+		-	+/-
Ab4	+	+		+
Ab5	+/-		-	-

Los anticuerpos anti-hNav_v1.7 seleccionados demostraron unión a neuronas DRG que expresaban una proteína Nav_v1.7 humana (por ejemplo, Ab3, Ab4, y Ab5), una proteína Nav_v1.7 quimérica (por ejemplo, Ab4) o una proteína Nav_v1.7 de ratón (por ejemplo, Ab2) sobre la superficie celular, mientras que no se observó unión a neuronas DRG que expresaban una proteína Nav_v1.7 de ratón o rata para otros anticuerpos (por ejemplo, Ab1 y Ab5). Otros anticuerpos anti-hNav_v1.7 demostraron reactividad cruzada de especie porque los anticuerpos mostraron unión a neuronas DRG de ratones con Nav_v1.7 humanizado, ratones de tipo silvestre y ratas (por ejemplo, Ab3 y Ab4).

Ensayo de liberación de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). El neuropéptido péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) se libera de terminales periféricos y espinales de neuronas nociceptivas peptidérgicas de fibras A y C en respuesta a estímulos. La liberación de neuropéptido inicia la inflamación neurogénica, la desgranulación de mastocitos, y otras reacciones inflamatorias, que provocan hiperalgesia/sensación de dolor. Mediadores inflamatorios tales como prostaglandina E2, bradicinina, serotonina, histamina y capsaicina sensibilizan directamente y excitan DRG nociceptivo *in vitro* e *in vivo* conduciendo de ese modo a liberación de CGRP. Los nociceptores sensibilizados presentan un umbral más bajo de activación, actividad espontánea aumentada y una respuesta aumentada a estímulos supraumbral. Por tanto, la sensibilización de DRG y el disparo de potenciales de acción pueden conseguirse *in vitro* con diferentes mediadores inflamatorios provocando la liberación de CGRP y sirviendo de ese modo como un medio para medir la función nociceptiva de DRG. La activación nociceptores primarios se determinó en cultivos de DRG *in vitro* primarios aislados de ratones con Nav_v1.7 humanizado y de tipo silvestre por medición de la liberación de CGRP usando un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) (Cayman, distribuido por SPLbio, Francia).

En resumen, se lavaron DRG entre 3 a 8 días de edad una vez en tampón de ensayo y se mantuvieron a 37 °C hasta la adición de una mezcla inflamatoria (por ejemplo, prostaglandina E2 10 µM, bradicinina 10 µM, y capsaicina 1 µM). Se usaron dos inhibidores conocidos de canales Nav_v, tetrodotoxina (TTX) y ProTx-II, para determinar si Nav_v1.7 desempeña un papel en una liberación inducida por mezcla inflamatoria de CGRP *in vitro*. TTX se ensayó a concentraciones de 1 µM, una concentración inhibitoria eficaz para canales sensibles a TTX, y 10 µM. ProTx-II inhibe en gran medida Nav_v1.7 a 10 nM (Schmalhofer, W.A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M.G., Weinglass, A.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Koltzenburg, M., Priest, B.T. (2008) ProTx-II, a Selective Inhibitor of Nav1.7 Sodium Channels, Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors. *Molecular Pharmacology* 74(5):1476-1484). Las neuronas se incubaron durante 20 minutos con el inhibidor (TTX o ProTx-II), seguido de estimulación con la mezcla inflamatoria durante 20 minutos o con el inhibidor combinado con la mezcla inflamatoria durante 20 minutos. Se prepararon diluciones del compuesto en tampón de ensayo y se añadieron las muestras por duplicado en una placa EIA de CGRP humano y se incubaron durante una noche. La concentración de CGRP liberado por DRG se midió el siguiente día usando un ensayo ELISA. Se calcularon promedios (media +/- desviación típica) para cada grupo de condiciones. La FIG. 8 muestra la respuesta a dosis para diferentes concentraciones de DRG en los ensayos de CGRP usando TTX en las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados para TTX se muestran en la Tabla 3. Los resultados para ProTx-II se muestran en la Tabla 4. IM: mezcla inflamatoria.

En un experimento similar, se ensayó el papel de Na_v1.7 en la liberación potenciadora de TTX de CGRP en DRG recogidos de ratones *Scn9a*^{3.1/3.1} usando un anestésico local tipo amino amida (Lidocaína). Este experimento se realizó para confirmar que la potenciación de la liberación de CGRP no se debía a un efecto no específico de las toxinas sobre neuronas DRG. Los resultados se muestran en la Tabla 5. IM: mezcla inflamatoria.

En otro experimento similar, se analizaron anticuerpos anti-hNa_v1.7 seleccionados para su efecto sobre la liberación de CGRP *in vitro* en DRG aislado de ratones *Scn9a*^{+/+}, *Scn9a*^{hum/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Los resultados se muestran en las Tablas 6 - 9. IM: mezcla inflamatoria.

Como se muestra en este Ejemplo, cuando se pre-incuban neuronas (DRG) que expresan una proteína Na_v1.7 de tipo silvestre o quimérica sobre la superficie celular con inhibidores conocidos de Na_v1.7 (TTX o ProTx-II, Tabla 3 o 4, respectivamente) o un anestésico local no específico de Na_v1.7 (Lidocaína, Tabla 5), la liberación inducida por mezcla inflamatoria de CGRP se potencia notablemente. Sin embargo, cuando se añadía un inhibidor de Na_v1.7 o anestésico local a la mezcla inflamatoria antes de la exposición a las neuronas, no se observaba potenciación de la liberación inducida por inflamación de CGRP. Por tanto, estos experimentos muestran que la inhibición de Na_v1.7 antes de la estimulación con mediadores inflamatorios (prostaglandina E₂, bradicinina, y capsaicina) potencia la liberación de CGRP en neuronas DRG de ratones de tipo silvestre y humanizado.

Además, cuando las neuronas (DRG) se pre-incuban con un anticuerpo anti-hNa_v1.7, la liberación inducida por mezcla inflamatoria de CGRP se potencia notablemente (Tablas 6 - 9). Estos experimentos demuestran que las proteínas Na_v1.7 humana y quimérica expresadas sobre la superficie de DRG en ratones humanizados son funcionales. Este Ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-hNa_v1.7 eran capaces de imitar la potenciación mediada por TTX de la liberación inducida por mediador inflamatorio de CGRP en neuronas DRG de ratones *Scn9a*^{hum/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Por tanto, los ratones con Na_v1.7 humanizado (*Scn9a*^{hum/+}, *Scn9a*^{3.1/3.1} y *Scn9a*^{3.3/3.3}) descritos en este documento proporcionan un sistema para la caracterización *in vitro* de unión de anticuerpo anti-hNa_v1.7 es inhibición de la función del canal *in vivo*. Además, estos ratones representan un sistema de modelo *in vivo* para el examen de nuevos antagonistas específicos de Na_v1.7 y la evaluación de su potencial terapéutico para tratar respuestas mediadas por Na_v1.7.

Tabla 3

CGRP liberado de <i>Scn9a</i> ^{+/+} Condiciones	DRG expuesto a TTX CGRP (pg/ml)
Tampón	3 ± 1
IM	11 ± 1
TTX 1 µM pre-incubación e IM	76 ± 14
TTX 1 µM + IM	10 ± 4
IM	11 ± 4
TTX 10 µM pre-incubación e IM	44 ± 7

Tabla 4

CGRP liberado de <i>Scn9a</i> ^{+/+} Condiciones	DRG expuesto a Pro-TxII CGRP (pg/ml)
IM	55 ± 5
Pro-TXII 10 nM pre-incubación e IM	186 ± 40
Pro-TXII 100 nM pre-incubación e IM	126 ± 25

Tabla 5

CGRP liberado de <i>Scn9a</i> ^{3.1/3.1} Condiciones	DRG expuesto a Lidocaína CGRP (pg/ml)
Lidocaína 5 mM pre-incubación e IM	40 ± 6
Lidocaína 5 mM + IM	12 ± 1

Tabla 6

CGRP liberado de <i>Scn9a</i> ^{+/+} Condiciones	DRG expuesto a anticuerpo anti-hNa _v 1.7 CGRP (pg/ml)
IM	172 ± 17
Ab1	29 ± 4
Ab1 pre-incubación e IM	168 ± 11
Ab2	35 ± 2
Ab2 pre-incubación e IM	522 ± 32
Ab4	21 ± 5
Ab4 pre-incubación e IM	430 ± 2
Ab5	39 ± 6
Ab5 pre-incubación e IM	62 ± 2

Tabla 7

CGRP liberado de Scn9a^{hum/+} DRG expuesto a anticuerpo anti-hNa_v1.7	Condiciones	CGRP (pg/ml)
	Tampón	26 ± 1
	IM	21 ± 1
	Ab1 pre-incubación e IM	97 ± 14
	Ab1 + IM	19 ± 10
	Ab4 pre-incubación e IM	122 ± 35
	Ab4 + IM	26 ± 1
	Ab5 pre-incubación e IM	82 ± 19
	Ab5 + IM	20 ± 1

Tabla 8

CGRP liberado de Scn9a^{hum/+} DRG expuesto a anticuerpo anti-hNa_v1.7	Condiciones	CGRP (pg/ml)
	IM	30 ± 7
	Ab4 pre-incubación e IM	81 ± 12
	Ab5 pre-incubación e IM	117 ± 1

Tabla 9

CGRP liberado de Scn9a^{3.17/3.1} DRG expuesto a anticuerpo anti-hNa_v1.7	Condiciones	CGRP (pg/ml)
	IM	27 ± 3
	Ab1 + IM	12 ± 2
	Ab1 pre-incubación e IM	38 ± 7
	Ab4 pre-incubación e IM	101 ± 2
	Ab5 pre-incubación e IM	47 ± 6

5 Ejemplo VII

Generación de línea celulares inmortalizadas de DRG a partir de ratones humanizados

10 Pueden aislarse neuronas DRG de ratones humanizados e inmortalizarse para estudio continuo a largo plazo de la función del canal Na_v1.7 humano *in vitro*.

15 Las neuronas DRG pueden inmortalizarse por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento US 2009/0298095A1). Normalmente la inmortalización de DRG aislados se consigue empleando un vector de origen retroviral que se ha modificado por ingeniería con secuencias de ADN que codifican un oncogén (por ejemplo, myc) y un marcador de selección (por ejemplo, neomicina). Los oncogenes adecuados que pueden clonarse en un vector para inmortalizar una célula DRG aislada incluyen factores de crecimiento o mitógenos (por ejemplo, c-Sis), receptores tirosina quinasa (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular), tirosina quinasa citoplasmáticas (por ejemplo, familia Src, familia Syk-ZAP-70, y familia BTK de tirosina quinasa), serina/treonina quinasa citoplasmáticas y sus subunidades reguladoras (por ejemplo, sobre-expresión de Raf quinasa y quinasas dependientes de ciclina), GTPasas reguladoras (por ejemplo, Ras), y factores de transcripción (por ejemplo, myc). Una vez construido el vector para albergar ambas secuencias de ADN de modo que tenga capacidad de transcripción dentro de la célula, puede usarse para crear una línea celular inmortalizada de DRG por transfección en DRG aislados de un ratón humanizado descrito en los Ejemplos 2 - 4.

25 En resumen, pueden prepararse neuronas DRG primarias disociadas por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Wood J.N., Bevan, S.J., Coote, P.R., Dunn, P.M., Harmor, A. Hogan, P. Latchman, D.S., Morrison, C., Rougon, G., Theveniau, M., Wheatley, S. 1990. Novel Cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. Proceedings of Biological Sciences, The Royal Society 241(1302):187-94; Raymond, H.K., Thode, S., Zhou, J., Friedman, G.C., Pardinas, J.R., Barrere, C., Johnson, R.M., Sah, D.W.Y. 1999. Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. Journal of Neuroscience 19(13):5420-5428; Chen, W., Mi, R., Haughey, N., Oz, M., Hoke, A. 2007. Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line. J of the Peripheral Nervous System 12:121-130). Los cultivos de DRG aislados que expresan un Na_v1.7 humano como se describe en los Ejemplos 2 - 4 después se transfectan, por ejemplo por electroporación, con un vector candidato modificado por ingeniería como se ha descrito anteriormente.

40 Después de transfección, se cultivan cultivos celulares en medio de selección y se mantienen en el medio de selección durante hasta 1-2 semanas hasta que se forman colonias aisladas con 200-300 células. Las colonias se pican y expanden usando métodos convencionales de cultivo cuando alcanzan aproximadamente un 80-90 % de confluencia. Las células del cultivo pueden seleccionarse para la expresión de proteína Nave1.7 humana por

transferencia de Southern o Western usando sondas diseñadas a partir de la secuencia de Na_ve1.7 humano. Como alternativa, la confirmación de la proteína de canal Na_v1.7 humano en las células transfectadas puede conseguirse por reacción en cadena de la polimerasa sobre ADN o ARN aislado de las células transfectadas.

5 Una vez que la línea celular neuronal inmortalizada de DRG ha demostrado capacidad de auto-replicación durante múltiples generaciones, será adecuada para varios ensayos diferentes, incluyendo, por ejemplo, análisis de propiedades neuronales del canal Na_v1.7 humano, ensayos de toxicidad neuronal, medición de respuesta de DRG a estímulos nociceptivos, ensayos de pinzamiento zonal, selección de fármacos de alto rendimiento, y ensayo de bloqueantes específicos de Na_v1.7 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Na_v1.7).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

15

<120> Ensayo de liberación de neuropéptido para canales de sodio

<130> 210-002EPT2

20

<150> EP 12167014.5

<151> 07-05-2012

<150> US 13/236.117

<151> 19-09-2011

25

<150> US 13/155.491

<151> 08-06-2011

<150> US 61/485.488

<151> 12-05-2011

30

<160> 43

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

35

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Sintética

<400> 1

gggactctc tgggtcagt ta 22

45

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Sintética

<400> 2

55

aaaggctctc aatgggaaac aag 23

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

65

<400> 3

tcaatgactt gacataatgc atgcactcc 29

ES 2 541 535 T3

5 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 4
atgtcagcca atccttctaa agtg 24

15 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 5
cgtttgct aaggcgtac20

25 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 6
tcctatgagc ccatcacaac cacac 25

35 <210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 7
ggtggagagg ctattcggc 19

50 <210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintética

<400> 8
gaacacggcg gcatcag 17

60 <210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Sintética

<400> 9
tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

ES 2 541 535 T3

5 <210> 10
<211> 115
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 10

ctagctgagc tgtcaccaca cattgctcct accacgtatt gtacagctac tgcaagagca 60
ccacagttgg ctttctgtat cataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttat 115

15 <210> 11
<211> 148
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

20 <400> 11

ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatagcttc ggttttgata cactgtttac 60
agcctgcgaa ggtgactcac tcgtgtaat aagactcttt tacggaggtc tatgccaac 120
tctttttatc aatattctc aaaggcag 148

25 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 12
atcaaaggaa cccaaagaag 20

35 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 13
gaagggcagc tgttgccag 20

50 <210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

55 <400> 14
atgaagaagc cccaaagcca agca 24

60 <210> 15
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 541 535 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 15
tgcggccgat cttagcc 17

10 <210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

20 <400> 16
ttgaccgatt ccttgagg 18

25 <210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <400> 17
acgagcgggt tcggcccatt c 21

40 <210> 18
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

50 <400> 18

ttaggtaagg atccgaagg gaaataaac ctacaggatg agaagatggc aatggtgect 60
ccccaggac ctcagagctt tgtccatttc acaaacag 99

55 <210> 19
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sintética

65 <400> 19

gtatgaataa aaaagcattg aatagggat tcttgccaac ttgctctctc gagataactt 60
cgtataatgt atgctatacg aagttat 87

70 <210> 20
<211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Sintética

80 <400> 20

ES 2 541 535 T3

tatacgaagt tatgctagta actataacgg tcctaaggta gcgagctagc agcttcggtt 60
ttgatacact gtttacagcc tgcgaaggtg 90

5 <210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 21
ggactacaac tgttatggg caac 24

15 <210> 22
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 22
tcaattcttc ttactctca gcag24

25 <210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 23
tccggaagga ccttgagcag aatga 25

35 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 24
caacaggtga gcagcaacag 20

50 <210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

55 <400> 25
gcaggagaca catacaccag ac 22

60 <210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

ES 2 541 535 T3

<400> 26
aaacacgcat gctcgaagcc agtcgg 26

5 <210> 27
<211> 201
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 27

tacattttaa ggactaaaa ccatcgtggg ggccctgac caatcagtga agaagctctc 60
tgacgcatg atcctcactg tgttctgtct cagtgtgttc gactaattg gactacagct 120
gttcatggga aacctgaagc ataaatggtt tcgaaattca cttgaaaata atgaaacatt 180
agaaagcata atgaatacc t 201

15 <210> 28
<211> 157
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <400> 28

aggtgagtac caagagaaac atgcattgta tttttgaatg gcatatgtac ctggtgtatg 60
ttaagagcct gtattaggag gttttttatt tatttgagaa tggaggaaac tctattactc 120
gagataactt cgtataatgt atgctatac g aagttat 157

30 <210> 29
<211> 141
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 29

tatacgaagt tatgctagct ctgcagacag tctgggactc cctaattgtgc attattaata 60
ttacaggcaa tttacttggc tgatattgaga acagatagtt ctgaagtcac caataatttt 120
ctgctgtgtc tgaccagcgt t 141

40 <210> 30
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

<400> 30
gcttggcct gcacctta 19

50 <210> 31
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 31
 tgcgttgacc actacctgat ac 22

10 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 32
 tctgcattgg cgtctgttg tca 23

25 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintética

30 <400> 33
 tgacttgccc tatcaatctg agatc 25

35 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintética

40 <400> 34
 gctcacactg tatacacaca aaatcttc 28

45 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <400> 35
 tcactgccta tgataaagt 19

55 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintética

60 <400> 36
 cacggtttc tgcaagtcaa 20

65 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 541 535 T3

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 37
 gggacactta caactgaag ca 22

10 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 38
 tcgtccgaa tgtttgccc ttatga 26

25 <210> 39
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

30 **tttcatttat ttgaagtgca atatcatctt ggcacatctac tcctctgtat gctagtaggt 60**
aagcctgggtg atcacaga 78

35 <210> 40
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintética

45 <400> 40

50 **gactagtata caattacaaa tatgcctoga gataacttcg tataatgtat gctatacгаа 60**
gttat 65

55 <210> 41
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 41

70 **tatacgaagt tatgctagct ttcttgctaa ccatcattct ggggtatgtg ttatgatgga 60**
agttaagtga cagttactta taatatggct gct 93

75 <210> 42
 <211> 9771
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

80 <220>
 <223> Sintética

ES 2 541 535 T3

<400> 42

cggggctgct acctccacgg gcgcgcacctg gcaggagggg cgcagctctgc ttgcaggcgg 60
tcgccagcgc tccagcggcg gctgtcggct ttccaattcc gccagctcgg ctgaggctgg 120
gctagcctgg gtgccagtgg ctgctagcgg caggcgtccc ctgagcaaca ggagcccaga 180

gaaaaagaag cagccctgag agagcgccgg ggaaggagag gccccgcgcc tctcctggag 240
ccagattctg caggtgcact ggggtggggat gatcggcggg ctaggttgca agcctcttat 300
gtgaggagct gaagaggaat taaaatatac aggatgaaaa gatggcaatg ttgcctcccc 360
caggacctca gagctttgtc catttcacaa aacagtctct tgcctcatt gaacaacgca 420
ttgctgaaag aaaatcaaag gaaccocaaag aagaaaagaa agatgatgat gaagaagccc 480
caaagccaag cagtgacttg gaagctggca aacagctgcc ctcatctat ggggacattc 540
ctcccgcat ggtgtcagag ccctggagg acttgacc ctaactatgca gacaaaaaga 600
ctttcatagt attgaacaaa gggaaaacaa tcttccgttt caatgccaca cctgctttat 660
atatgctttc tcctttcagt cctctaagaa gaatatctat taagatttta gtacactcct 720
tattcagcat gctcatcatg tgcactattc tgacaaactg catatztatg accatgaata 780
accaccgga ctggaccaaa aatgtcagat acacttttac tggaatatat acttttgaat 840
cacttgtaaa aatccttgca agaggctct ctgtaggaga attcactttt ctctgtgacc 900
cgtggaactg gctggatfff gtctcattg tttttgcgta tttaacagaa tttgtaaac 960
taggcaatgt ttcagctctt cgaactttca gagtattgag agctttgaaa actatctctg 1020
taatcccagg cctgaagaca attgtagggg ctttgatcca gtcagtgaag aagctttctg 1080
atgtcatgat cctgactgtg ttctgtctga gtgtgtttgc actaattgga ctacagctgt 1140
tcatgggaaa cctgaagcat aaatgtttc gaaattcact tgaaaataat gaaacattag 1200
aaagcataat gaataccta gagagtgaag aagactttag aaaatatttt tattacttgg 1260
aaggatccaa agatgctctc ctttgtggtt tcagcacaga ttcaggtcag tgtccagagg 1320
ggtacacctg tgtgaaaatt ggcagaaaacc ctgattatgg ctacacgagc ctgtgacatt 1380
tcagctgggc cttcttagcc ttgtttagcc taatgaccca agattactgg gaaaaccttt 1440
accaacagac gctgcgtgct gctggcaaaa cctacatgat cttotttgtc gtagtgattt 1500
tctgggctc cttttatcta ataaacttga tcttggtgtg ggttgccatg gcatatgaag 1560
aacagaacca ggcaaacatt gaagaagcta aacagaaaga attagaattt caacagatgt 1620
tagaccgtct taaaaaagag caagaagaag ctgaggcaat tgcagcggca gcggtgaat 1680
atacaagtat taggagaagc agaattatgg gctctcaga gagttcttct gaaacatcca 1740
aactgagctc taaaagtgt aaagaaaagaa gaaacagaag aaagaaaaag aatcaaaaga 1800
agctctccag tggagaggaa aaggagatg ctgagaaatt gtogaaatca gaatcagagg 1860
acagcatcag aagaaaaagt ttccacctg gtgtcgaagg gcataggcga gcacatgaa 1920
agaggttgct taccoccat cagtcaccac tcagcattcg tggctccttg tttctgcaa 1980
ggcgaagcag cagaacaagt ctttttagtt tcaaaggcag aggaagagat ataggatctg 2040
agactgaatt tgccgatgat gagcacagca tttttggaga caatgagagc agaaggggct 2100
cactgtttgt gcccacaga cccagggagc gacgcagcag taacatcagc caagccagta 2160
ggtccccacc aatgctgccc gtgaacggga aatgcacag tgctgtggac tgcaacgggtg 2220
tggtctccct ggtgatgga cgtcagccc ctgagaaatt caatggacag cttctgccag 2280
agggcacgac caatcaata cacaagaaaa ggggtttag tagctatctc ctttcagagg 2340
atatgctgaa tgatcccaac ctcagacaga gagcaatgag tagagcaagc atattaacia 2400
acactgtgga agaactgaa gactccagac aaaatgtcc accttggtgg tacagatttg 2460
cacacaaatt cttgatctgg aattgctctc catattggat aaaattcaaa aagtgtatct 2520
atthtattgt aatggatcct tttgtagatc ttgcaattac catttgcata gttttaaaca 2580
cattatthtatt ggctatggaa caccacccaa tgactgagga attcaaaaat gtacttgcta 2640
taggaaatthtatt ggtcttact ggaatctttg cagctgaaat ggtattaaaa ctgttgcca 2700
tggatccata ttagtatttc caagtaggct ggaatatttt tgacagcctt attgtgctt 2760
taagtttagt ggagctcttt ctagcagatg tggaggatt gtcagttctg cgatcattca 2820
gactgctccg agtcttcaag ttggcaaaat cctggccaac attgaacatg ctgattaaga 2880
tcattggtaa ctcagtaggg gctctaggtg acctcacctt agtgttggcc atcatcgtct 2940
tcattttttgc tgtggtcggc atgcagctct ttggttaagag ctacaaagaa tgtgtctgca 3000
agatcaatga tgactgtacg ctcccacggg ggcacatgaa cgacttcttc cactccttcc 3060
tgattgtggt ccgctgctg tgtggagagt ggatagagac catgtgggac tgtatggagg 3120
tcgctggtca agctatgtc cttattgtht acatgatggt catggtcatt gaaacctgg 3180
tggtcctaaa cctatttctg gccttattat tgagctcatt tagttcagac aatcttacag 3240
caattgaaga agacctgat gcaaaacaacc tccagattgc agtgactaga attaaaaagg 3300
gaataaatta tgtgaacaa acctacgtg aatttattct aaaagcattt tccaaaaagc 3360
caaagatttc cagggagata agacaagcag aagatctgaa tactaagaag gaaaactata 3420
tttctaacca tacactgct gaaatgagca aaggtcacia tttcctcaag gaaaaagata 3480
aaatcagtggt ttttggaaag agcgtggaca aacacttgat ggaagacagt gatggtcaat 3540
cattttattca caatcccagc ctcacagtga cagtgccaat tgcacctggg gaatccgat 3600
tggaaaatat gaaactgag gaacttagca gtgattcgga tagtgaatac agcaaaagta 3660
gattaaacgg ctcaagctcc tcagagtcca gcacagttga taacctttg cctggagaag 3720
gagaagaagc agagctgaa cctatgaatt ccgatgagcc agaggcctgt ttcacagatg 3780
gttgtgtacg gaggttctca tgctgccaag ttaacataga gtcagggaaa ggaaaaatct 3840
ggtggaacat caggaaaacc tgctacaaga ttgttgaaca cagttggttt gaaagcttca 3900
ttgtcctcat gatcctgctc agcagtggtg ccctggcttt tgaagatatt tatattgaaa 3960

ggaaaaagac cattaagatt atcctggagt atgcagacaa gatcttcaact tacatcttca 4020
 ttctggaat gcttctaata ttgatagcat atggttataa aacatatttc accaatgcct 4080
 ggtgtggct ggatttecta attgttgatg tttctttggt tacttttagtg gcaaactc 4140
 ttggctactc agatcttggc cccattaat cccttcggac actgagagct ttaagacctc 4200
 taagagcctt atctagattt gaaggaatga gggctcgttg gaatgcactc ataggagcaa 4260
 ttcttccat catgaatgtg ctacttgtgt gtcttatatt ctggctgata ttcagcatca 4320
 tgggagtaaa tttgtttgct ggcaagttct atgagtgtat taacaccaca gatgggtcac 4380
 ggttctctgc aagtcaagtt ccaaatcgtt ccgaatgttt tgccttatg aatgtagtc 4440
 aaaatgtgog atggaaaaac ctgaaagtga accttgataa tgtoggactt ggttacctat 4500
 ctctgcttca agttgcaact tttaagggat ggacgattat tatgtatgca gcagttagtt 4560
 ctgttaatgt agacaagcag cccaaatatg aatatagcct ctacatgtat atttattttg 4620
 tctgtcttat catctttggg tcattcttca ctttgaactt gttcattggt gtcacatag 4680
 ataatttcaa ccaacagaaa aagaagcttg gaggtcaaga catctttatg acagaagaac 4740
 agaagaaata ctataatgca atgaaaaagc tggggtccaa gaagccacaa aagccaattc 4800
 ctgaccaggg gaacaaaatc caaggatgta tatttgacct agtgacaaat aagcctttg 4860
 atattagtat catggttctt atctgtctca acatggtaac catgatggtg gaaaaggagg 4920
 gtcaaagtca acatatgact gaagttttat attggataaa tgtggttttt ataactcttt 4980
 tcaactggaga atgtgtgcta aaactgatct cctcagaca ctactacttc actgtaggat 5040
 ggaatatttt tgattttgtg gttgtgatta tctccattgt aggtatggtt ctagtgtatt 5100
 tgattgaaac gtattttgtg tcccctacct tgttccgagt gatccgtctt gccaggttg 5160
 gccgaatcct acgtctagt c aaaggagcaa aggggatccg cacgctgctc tttgctttga 5220
 tgatgtccct tctctgcttg ttaacatgc gctcctgct cttcctggtc atgtcatct 5280
 acgccatctt tggaatgtcc aactttgcct atgttaaaaa ggaagatgga attaatgaca 5340
 tgttcaattt tgagaccttt ggcaacagta tgatttgctt gttccaaatt acaacctctg 5400
 ctggctggga tggattgcta gcacctatc ttaacagtaa gccaccgac tgtgaccaa 5460
 aaaaagttca tccctggaagt tcagttgaag gagactgtgg taaccatct gttggaatat 5520
 tctactttgt tagttatact atcatatcct tccctggttgt ggtgaacatg tacattgcag 5580
 tcatactgga gaattttagt gttgccactg aagaagtac tgaacctctg agtgaggatg 5640
 actttgagat gttctatgag gtttggaga agtttgatcc cgatgagacc atgttatag 5700
 agttctctaa actctctgat tttgcagctg ccttgatcc tctctctctc atagcaaac 5760
 ccaacaaagt ccagctcatt gccatggatc tgcccattgt tagtggtgac cggatccatt 5820
 gtcttgacat cttatttgc tttacaaagc gtgttttggg tgagagtggg gagatggatt 5880
 ctcttcgttc acagatggaa gaaaggttca tgtctgcaaa tcttccaaa gtgtcctatg 5940
 aacctatcac aaccacacta aaacggaaac aagaggatgt gtctgctact gtcattcagc 6000
 tgctttatag acgttaccgc ttaaggcaaa atgtcaaaaa tatatcaagt atatacata 6060
 aagatggaga cagagatgat gatttactca ataaaaaga tatggctttt gataatgta 6120
 atgagaactc aagtccagaa aaaacagatg ccacttcac caccacctct ccacctcat 6180
 atgatagtgt aacaaagcca gacaaagaga aatatgaaca agacagaaca gaaaaggaag 6240
 acaaagggaa agacagcaag gaaagcaaaa aatagagctt catttttgat atattgttta 6300
 cagcctgtga aagtgattta tttgtgttaa taaaactctt ttgaggaagt ctatgocaaa 6360
 atccttttta tcaaaatatt ctogaaggca tgcagtcac taactctgat tctcagaa 6420
 aggtggggcag cattagcaga tggttatttt tgcactgatg attctttaag aatcgtaa 6480
 gaactctgta ggaattattg attatagcat acaaaagtga ttcagttttt tggtttttaa 6540
 taaatcagaa gacctgtag aaaactttta catctgcctt gtcactcttt cacaggattg 6600
 taattagtct tgtttcccat gtaataaac aacacacgca tacagaaaa tctattattt 6660
 atctattatt tggaaatcaa caaaagtatt tgccttggct ttgcaatgaa atgcttgata 6720
 gaagtaatgg acattagtta tgaatgttta gttaaaatgc attattaggg agcttgactt 6780
 tttatcaatg tacagaggtt attctatatt ttgaggtgct taaatttatt ctacattgca 6840
 tcagaocaa tttatatgtg cctataaat gccatgggat taaaaatata tgtaggctat 6900
 tcaattctac aatgtttttt cattcatctt gactcacatg ccaacaagga taagacttac 6960
 ctttagagta ttgtgtttca tagcctttct tctttcatat ccctttttgt tcatagaata 7020
 accacagaac ttgaaaaatt attctaagta catattacac tctcaaaaa aaacaaagat 7080
 aactgagaaa aaagtattg acagaagttc tatttgctat tatttacata gcctaacatt 7140
 tgactgtgct gccaaaata ctgataatag tctctaaac tcttttgctc aatttctctg 7200
 cttcttatg cagtattgtt tagtcatcct ttcogctgaa gcaaagttga tgaaatcctt 7260
 cctgatatgc agttagttgt ttgaccacgg tacatacttg agcagataat aacttgggca 7320
 cagtatttat tgcactcact gtatacaatc cctgttttgg caagctttca aatcatgtaa 7380
 tatgacagac tttacacaga tatgtgttta gtatgaataa aaaagcattg aaatagggat 7440
 tcttgccaac ttgctctctt gccaccaact tactttccta aattatggaa gtaactttt 7500
 ttgataatc ttcaatgtat acaatgagga agatgtcac ttctccttaa aattctatga 7560
 tgtgaaatat attttgctc atcaacaca gtaccatggg cttctaattt atcaagaca 7620
 tttcatttt gcattagctg tagacatcta gttttttgaa aacacctatt aatagtaatt 7680
 tgaaaagaaa taaccataat gctttttttc gtgagtttat ttcaggaata tgagacttt 7740

ES 2 541 535 T3

```

cttctataaa gttattcatg cacaggcaaa aattgagcta cacaggtaga atgtagtttt 7800
acttagaaga tttttgtggg aggttttgaa gcaaatatat aaaacaactt tcactaattt 7860
gctttccata tttaaaaaat aataaattac atttatataa taaatgttta aagcacatat 7920
ttttgttgt tctggcaatt taaaaagaaa gaggatttaa acgtacctat agaaacaaag 7980
atztatggtt aaagaatgag atcagaagtc tagaatgttt ttaaattgtg atatatttta 8040
caacatccgt tattactttg agacatttgt cctaactctac gtataaaact caatctaggg 8100
ctaaagattc tttataccat cttaggttca ttcactcttag gctatttgaa ccacttttta 8160
atttaatatg aaagacacca tgcagtgttt tccgagacta catagatcat tttatcacat 8220
acctaccaag cctggtggaa ataggttttg ataatttaag tagggaccta tacaaaatat 8280
attacattta tcagattttt aaatacattc aattaagaat ttaacatcac cttaaatttg 8340
aattcaatct accgttattt caaactcaca aatataactg cattatgaat acttacataa 8400
tgtagtaaga caagatgttt gacaggttcg tgtgtaattt tctattaatg tttttacatt 8460
gccttgtttt tatgtaaaat aaaaaatatg ggcaactggg ttgttaacaa cacaaatttct 8520
tcttagcatt tcaaaaatat atataaagtt gttctttttc ctatttcatg aactatgttt 8580
tttttaaaa taacatgggt aagttttata tatatttacg tttgtttcag gaatgtctac 8640
ttgtgacttt ttatcaatta aaaataatat ttggaagaaa gagcttatta agtataagct 8700
tgaagtaaaa ttagacctct ctttccatgt agattactgt ttgtactgat ggtttcaccc 8760
ttcagaaggc actgtcatat taatatttaa atttataat cgctgaactt attacacca 8820
acaatacaga aaggcagtta cactgaagaa ctttaacttag aataaaatgg aagcaaacag 8880
gttttctaaa aactttttta agtgaccagg tctcgtctcg tcaccacaggc tagagtgcaa 8940
tggcatgatc atagctctct gcagcctcaa ctctgggctc aagcaaccct cctgcctcag 9000
cctcccaagt agctaagact acaggtacat gccaccatgc ctggctaata tttaaatttt 9060
tgtagataag gggctctgct atggtgcca ggctagtctc aaactcctgg cttcaagtgt 9120
tctactgtc atgacctgcc aacatgctgg ggttacaggc atgagccacc atgccccaaa 9180
caggtttgaa cacaaatctt tcggatgaaa attagagaac ctaattttag ctttttgata 9240
gttacctagt ttgcaaaaga tttgggtgac ttgtgagctg tttttaaag ctgattgttg 9300
aacatcacia cccaaaatac ttagcatgat tttatagagt tttgatagct ttattaaaaa 9360
gagtgaat aaatgcata tgtaataaaa gcagttctaa atagctattt cagagaaatg 9420
ttaatagaag tgctgaaaga agggccaact aaattagat ggccaggga ttggcctggg 9480
tttaggacct atgtatgaag gccaccaatt ttttaaaaat atctgtggtt tattatgta 9540
ttatcttctt gaggaaaaca atcaagaatt gcttcatgaa aataaataaa tagccatgaa 9600
tatcataaag ctgtttacat aggattcttt acaatttca tagatctatg aatgctcaa 9660
atgtttgagt ttgccataaa ttatattgta gttatattgt agttatactt gagactgaca 9720
cattgtaata taatctaaga ataaaagtta taaaaataa aaaaaaaaaa a 9771

```

<210> 43
 <211> 1977
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 43

ES 2 541 535 T3

Met	Ala	Met	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Val	His	Phe	Thr
1				5					10					15	
Lys	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Ile	Ala	Glu	Arg	Lys	Ser
			20					25					30		
Lys	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Ala	Pro	Lys
		35					40					45			
Pro	Ser	Ser	Asp	Leu	Glu	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gly
	50					55					60				
Asp	Ile	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Pro
65				70					75					80	
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Lys	Thr	Phe	Ile	Val	Leu	Asn	Lys	Gly	Lys	Thr
			85						90					95	
Ile	Phe	Arg	Phe	Asn	Ala	Thr	Pro	Ala	Leu	Tyr	Met	Leu	Ser	Pro	Phe
			100					105					110		
Ser	Pro	Leu	Arg	Arg	Ile	Ser	Ile	Lys	Ile	Leu	Val	His	Ser	Leu	Phe
		115					120					125			
Ser	Met	Leu	Ile	Met	Cys	Thr	Ile	Leu	Thr	Asn	Cys	Ile	Phe	Met	Thr
	130					135					140				
Met	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Lys	Asn	Val	Glu	Tyr	Thr	Phe	Thr

145					150					155				160	
Gly	Ile	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ser	Leu	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe
				165					170					175	
Cys	Val	Gly	Glu	Phe	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Pro	Trp	Asn	Trp	Leu	Asp
			180					185					190		
Phe	Val	Val	Ile	Val	Phe	Ala	Tyr	Leu	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	Leu	Gly
		195					200					205			
Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Arg	Thr	Phe	Arg	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Lys	Thr
	210					215					220				
Ile	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Thr	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Gln
225					230					235				240	
Ser	Val	Lys	Lys	Leu	Ser	Asp	Val	Met	Ile	Leu	Thr	Val	Phe	Cys	Leu
			245						250					255	
Ser	Val	Phe	Ala	Leu	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Phe	Met	Gly	Asn	Leu	Lys
			260					265					270		
His	Lys	Cys	Phe	Arg	Asn	Ser	Leu	Glu	Asn	Asn	Glu	Thr	Leu	Glu	Ser
	275						280					285			
Ile	Met	Asn	Thr	Leu	Glu	Ser	Glu	Glu	Asp	Phe	Arg	Lys	Tyr	Phe	Tyr
290						295					300				
Tyr	Leu	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Cys	Gly	Phe	Ser	Thr	Asp
305					310					315					320
Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Cys	Val	Lys	Ile	Gly	Arg	Asn
			325						330					335	
Pro	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Ser	Phe	Asp	Thr	Phe	Ser	Trp	Ala	Phe	Leu
			340					345					350		
Ala	Leu	Phe	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Tyr	Trp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Gln
		355					360					365			
Gln	Thr	Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Lys	Thr	Tyr	Met	Ile	Phe	Phe	Val	Val
	370					375					380				
Val	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Ala	Val
385					390					395				400	
Val	Ala	Met	Ala	Tyr	Glu	Glu	Gln	Asn	Gln	Ala	Asn	Ile	Glu	Glu	Ala
			405						410					415	
Lys	Gln	Lys	Glu	Leu	Glu	Phe	Gln	Gln	Met	Leu	Asp	Arg	Leu	Lys	Lys
			420					425					430		
Glu	Gln	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr
			435				440					445			
Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Arg	Ile	Met	Gly	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Glu
	450					455					460				
Thr	Ser	Lys	Leu	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Lys	Glu	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg
465						470				475					480
Lys	Lys	Lys	Asn	Gln	Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Glu	Lys	Gly	Asp
			485						490					495	
Ala	Glu	Lys	Leu	Ser	Lys	Ser	Glu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ile	Arg	Arg	Lys
			500				505						510		
Ser	Phe	His	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	His	Arg	Arg	Ala	His	Glu	Lys	Arg
	515						520					525			
Leu	Ser	Thr	Pro	Asn	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe
	530					535					540				
Ser	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Lys	Gly	Arg
545						550				555					560
Gly	Arg	Asp	Ile	Gly	Ser	Glu	Thr	Glu	Phe	Ala	Asp	Asp	Glu	His	Ser
			565						570					575	
Ile	Phe	Gly	Asp	Asn	Glu	Ser	Arg	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe	Val	Pro	His
			580					585					590		
Arg	Pro	Gln	Glu	Arg	Arg	Ser	Ser	Asn	Ile	Ser	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser
		595					600					605			
Pro	Pro	Met	Leu	Pro	Val	Asn	Gly	Lys	Met	His	Ser	Ala	Val	Asp	Cys
	610					615					620				
Asn	Gly	Val	Val	Ser	Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Met	Leu	Pro
625					630					635				640	
Asn	Gly	Gln	Leu	Leu	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Gln	Ile	His	Lys	Lys
			645						650					655	

Arg Arg Cys Ser Ser Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Met Leu Asn Asp Pro
 660 665 670
 Asn Leu Arg Gln Arg Ala Met Ser Arg Ala Ser Ile Leu Thr Asn Thr
 675 680 685
 Val Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg Gln Lys Cys Pro Pro Trp Trp Tyr
 690 695 700
 Arg Phe Ala His Lys Phe Leu Ile Trp Asn Cys Ser Pro Tyr Trp Ile
 705 710 715 720
 Lys Phe Lys Lys Cys Ile Tyr Phe Ile Val Met Asp Pro Phe Val Asp
 725 730 735
 Leu Ala Ile Thr Ile Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Met
 740 745 750
 Glu His His Pro Met Thr Glu Glu Phe Lys Asn Val Leu Ala Ile Gly
 755 760 765
 Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Ala Ala Glu Met Val Leu Lys Leu
 770 775 780
 Ile Ala Met Asp Pro Tyr Glu Tyr Phe Gln Val Gly Trp Asn Ile Phe
 785 790 795 800
 Asp Ser Leu Ile Val Thr Leu Ser Leu Val Glu Leu Phe Leu Ala Asp
 805 810 815
 Val Glu Gly Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe
 820 825 830
 Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Met Leu Ile Lys Ile Ile
 835 840 845
 Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile
 850 855 860
 Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Ser
 865 870 875 880
 Tyr Lys Glu Cys Val Cys Lys Ile Asn Asp Asp Cys Thr Leu Pro Arg
 885 890 895
 Trp His Met Asn Asp Phe Phe His Ser Phe Leu Ile Val Phe Arg Val
 900 905 910
 Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp Asp Cys Met Glu Val Ala
 915 920 925
 Gly Gln Ala Met Cys Leu Ile Val Tyr Met Met Val Met Val Ile Gly
 930 935 940
 Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala Leu Leu Leu Ser Ser Phe
 945 950 955 960
 Ser Ser Asp Asn Leu Thr Ala Ile Glu Glu Asp Pro Asp Ala Asn Asn
 965 970 975
 Leu Gln Ile Ala Val Thr Arg Ile Lys Lys Gly Ile Asn Tyr Val Lys
 980 985 990
 Gln Thr Leu Arg Glu Phe Ile Leu Lys Ala Phe Ser Lys Lys Pro Lys
 995 1000 1005
 Ile Ser Arg Glu Ile Arg Gln Ala Glu Asp Leu Asn Thr Lys Lys Glu
 1010 1015 1020
 Asn Tyr Ile Ser Asn His Thr Leu Ala Glu Met Ser Lys Gly His Asn
 1025 1030 1035 1040
 Phe Leu Lys Glu Lys Asp Lys Ile Ser Gly Phe Gly Ser Ser Val Asp
 1045 1050 1055
 Lys His Leu Met Glu Asp Ser Asp Gly Gln Ser Phe Ile His Asn Pro
 1060 1065 1070
 Ser Leu Thr Val Thr Val Pro Ile Ala Pro Gly Glu Ser Asp Leu Glu
 1075 1080 1085
 Asn Met Asn Ala Glu Glu Leu Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Tyr Ser
 1090 1095 1100
 Lys Val Arg Leu Asn Arg Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val Asp
 1105 1110 1115 1120
 Asn Pro Leu Pro Gly Glu Gly Glu Glu Ala Glu Ala Glu Pro Met Asn
 1125 1130 1135
 Ser Asp Glu Pro Glu Ala Cys Phe Thr Asp Gly Cys Val Arg Arg Phe
 1140 1145 1150
 Ser Cys Cys Gln Val Asn Ile Glu Ser Gly Lys Gly Lys Ile Trp Trp

	1155		1160		1165														
Asn	Ile	Arg	Lys	Thr	Cys	Tyr	Lys	Ile	Val	Glu	His	Ser	Trp	Phe	Glu				
	1170						1175					1180							
Ser	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe				
1185						1190				1195					1200				
Glu	Asp	Ile	Tyr	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Thr	Ile	Lys	Ile	Ile	Leu	Glu				
					1205					1210					1215				
Tyr	Ala	Asp	Lys	Ile	Phe	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ile	Leu	Glu	Met	Leu	Leu				
			1220						1225					1230					
Lys	Trp	Ile	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Thr	Asn	Ala	Trp	Cys				
			1235					1240						1245					
Trp	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Val	Ala				
	1250					1255						1260							
Asn	Thr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly	Pro	Ile	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr				
1265					1270						1275				1280				
Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Phe	Glu	Gly	Met				
					1285					1290					1295				
Arg	Val	Val	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ile	Pro	Ser	Ile	Met	Asn				
					1300				1305					1310					
Val	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Phe	Trp	Leu	Ile	Phe	Ser	Ile	Met	Gly				
	1315							1320						1325					
Val	Asn	Leu	Phe	Ala	Gly	Lys	Phe	Tyr	Glu	Cys	Ile	Asn	Thr	Thr	Asp				
	1330					1335						1340							
Gly	Ser	Arg	Phe	Pro	Ala	Ser	Gln	Val	Pro	Asn	Arg	Ser	Glu	Cys	Phe				
1345					1350					1355					1360				
Ala	Leu	Met	Asn	Val	Ser	Gln	Asn	Val	Arg	Trp	Lys	Asn	Leu	Lys	Val				
					1365					1370					1375				
Asn	Phe	Asp	Asn	Val	Gly	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Val	Ala				
					1380				1385					1390					
Thr	Phe	Lys	Gly	Trp	Thr	Ile	Ile	Met	Tyr	Ala	Ala	Val	Asp	Ser	Val				
	1395							1400						1405					
Asn	Val	Asp	Lys	Gln	Pro	Lys	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Met	Tyr	Ile				
	1410					1415						1420							
Tyr	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Phe	Gly	Ser	Phe	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu				
1425					1430					1435					1440				
Phe	Ile	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Asn	Phe	Asn	Gln	Gln	Lys	Lys	Lys	Leu				
					1445					1450					1455				
Gly	Gly	Gln	Asp	Ile	Phe	Met	Thr	Glu	Glu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Asn				
					1460				1465					1470					
Ala	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Lys	Pro	Gln	Lys	Pro	Ile	Pro	Arg				
	1475						1480							1485					
Pro	Gly	Asn	Lys	Ile	Gln	Gly	Cys	Ile	Phe	Asp	Leu	Val	Thr	Asn	Gln				
	1490					1495						1500							
Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile	Met	Val	Leu	Ile	Cys	Leu	Asn	Met	Val	Thr				
1505					1510					1515					1520				
Met	Met	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Leu				
					1525					1530					1535				
Tyr	Trp	Ile	Asn	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Leu	Phe	Thr	Gly	Glu	Cys	Val				
					1540				1545					1550					
Leu	Lys	Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Val	Gly	Trp	Asn				
	1555							1560						1565					
Ile	Phe	Asp	Phe	Val	Val	Val	Ile	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Met	Phe	Leu				
	1570					1575						1580							
Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Thr	Tyr	Phe	Val	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Arg	Val				
1585					1590					1595					1600				
Ile	Arg	Leu	Ala	Arg	Ile	Gly	Arg	Ile	Leu	Arg	Leu	Val	Lys	Gly	Ala				
					1605					1610					1615				
Lys	Gly	Ile	Arg	Thr	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Met	Met	Ser	Leu	Pro	Ala				
					1620				1625					1630					
Leu	Phe	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Met	Phe	Ile	Tyr	Ala				
	1635					1640						1645							
Ile	Phe	Gly	Met	Ser	Asn	Phe	Ala	Tyr	Val	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile				
	1650					1655						1660							

Asn Asp Met Phe Asn Phe Glu Thr Phe Gly Asn Ser Met Ile Cys Leu
 1665 1670 1675 1680
 Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Gly Leu Leu Ala Pro Ile
 1685 1690 1695
 Leu Asn Ser Lys Pro Pro Asp Cys Asp Pro Lys Lys Val His Pro Gly
 1700 1705 1710
 Ser Ser Val Glu Gly Asp Cys Gly Asn Pro Ser Val Gly Ile Phe Tyr
 1715 1720 1725
 Phe Val Ser Tyr Ile Ile Ile Ser Phe Leu Val Val Val Asn Met Tyr
 1730 1735 1740
 Ile Ala Val Ile Leu Glu Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr
 1745 1750 1755 1760
 Glu Pro Leu Ser Glu Asp Asp Phe Glu Met Phe Tyr Glu Val Trp Glu
 1765 1770 1775
 Lys Phe Asp Pro Asp Ala Thr Gln Phe Ile Glu Phe Ser Lys Leu Ser
 1780 1785 1790
 Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu Leu Ile Ala Lys Pro Asn
 1795 1800 1805
 Lys Val Gln Leu Ile Ala Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg
 1810 1815 1820
 Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly
 1825 1830 1835 1840
 Glu Ser Gly Glu Met Asp Ser Leu Arg Ser Gln Met Glu Glu Arg Phe
 1845 1850 1855
 Met Ser Ala Asn Pro Ser Lys Val Ser Tyr Glu Pro Ile Thr Thr Thr
 1860 1865 1870
 Leu Lys Arg Lys Gln Glu Asp Val Ser Ala Thr Val Ile Gln Arg Ala
 1875 1880 1885
 Tyr Arg Arg Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Val Lys Asn Ile Ser Ser Ile
 1890 1895 1900
 Tyr Ile Lys Asp Gly Asp Arg Asp Asp Asp Leu Leu Asn Lys Lys Asp
 1905 1910 1915 1920
 Met Ala Phe Asp Asn Val Asn Glu Asn Ser Ser Pro Glu Lys Thr Asp
 1925 1930 1935
 Ala Thr Ser Ser Thr Thr Ser Pro Pro Ser Tyr Asp Ser Val Thr Lys
 1940 1945 1950
 Pro Asp Lys Glu Lys Tyr Glu Gln Asp Arg Thr Glu Lys Glu Asp Lys
 1955 1960 1965
 Gly Lys Asp Ser Lys Glu Ser Lys Lys
 1970 1975

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un antagonista de Na_v1.7, que comprende:
 - 5 (a) proporcionar *ex vivo* una célula que expresa una proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano de longitud completa, o una proteína de subunidad- α de Na_v1.7 quimérico que comprende un bucle extracelular de los dominios I o III de la subunidad- α de Na_v1.7 de ratón que se ha remplazado por el correspondiente bucle de una subunidad- α de Na_v1.7 humano;
 - 10 (b) poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo que se une a, o bloquea una función de, la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano o de la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 quimérico de (a) y esperar un primer periodo de tiempo;
 - (c) poner en contacto la célula de (b) con uno o más mediadores inflamatorios y esperar un segundo periodo de tiempo;
 - 15 (d) determinar la cantidad de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de la célula después de la etapa (c); y
 - (e) comparar la cantidad de CGRP liberado en la etapa (d) con la cantidad de CGRP liberado en presencia de un inhibidor conocido de canales de sodio, en donde un aumento en CGRP liberado en presencia de un compuesto de ensayo indica inhibición de Na_v1.7.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula neuronal, preferiblemente en el que la célula neuronal es una célula del ganglio de la raíz dorsal (DRG).
3. El método de la reivindicación 2, en el que la célula es una célula de ratón.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de CGRP liberado en presencia del compuesto de ensayo inhibe una o más funciones de la proteína Na_v1.7 humana o quimérica y es al menos 2 veces mayor que el inhibidor conocido de canales de sodio.
- 30 5. Un método para identificar un antagonista de Na_v1.7, que comprende:
 - (a) poner en contacto una célula DRG que expresa una proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano de longitud completa, o una proteína de subunidad α de Na_v1.7 quimérico que comprende un bucle extracelular de los dominios I o III de la subunidad- α de Na_v1.7 de ratón que se ha remplazado por el correspondiente bucle de una subunidad- α de Na_v1.7 humano con un compuesto de ensayo que se une a, o bloquea una función de, la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano o de la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 quimérico y esperar un primer periodo de tiempo;
 - 35 (b) poner en contacto el DRG de (a) con uno o más mediadores inflamatorios y esperar un segundo periodo de tiempo;
 - (c) determinar la cantidad de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado del DRG después de la etapa (b); y
 - 40 (d) comparar la cantidad de CGRP liberado en la etapa (c) con la cantidad de CGRP liberado en presencia de un inhibidor conocido de canales de sodio, en donde un aumento en CGRP liberado en presencia de un compuesto de ensayo indica inhibición de Na_v1.7.
- 45 6. El método de las reivindicaciones 1 o 5, en el que el agente se selecciona entre un anticuerpo, un péptido, un compuesto orgánico y una toxina, preferiblemente en el que el anticuerpo es humano.
7. El método de las reivindicaciones 1 o 5, en el que el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre prostaglandina E₂, bradicinina, capsaicina, protones y un factor neurotrófico, preferiblemente en el que el uno o más mediadores inflamatorios son prostaglandina E₂, bradicinina y capsaicina.
- 50 8. El método de la reivindicación 5, en el que el DRG se aísla de un miembro del grupo que consiste en ser humano, ratón, rata o mono, preferiblemente en el que el DRG se aísla de un ratón.
- 55 9. El método de las reivindicaciones 1 o 5, en el que la célula se aísla de un ratón modificado genéticamente que comprende, en su línea germinal, una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad- α de Na_v1.7 humano o un fragmento de la misma unida de forma funcional a un promotor Na_v.
- 60 10. El método de las reivindicaciones 1 o 5, en el que el inhibidor conocido de canales de sodio es tetrodotoxina o ProTx-II.
11. El método de las reivindicaciones 1 o 5, en el que la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano de longitud completa está codificada por los exones 2 a 28 de un gen de Na_v1.7 humano.
- 65 12. El método de la reivindicación 11, en el que la proteína de subunidad- α de Na_v1.7 humano de longitud completa

es una variante de Na_v1.7 humano.

5 13. El método de la reivindicación 12, en el que la variante de Na_v1.7 humano comprende una sustitución de aminoácido seleccionada entre Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G, F1449V, o una combinación de las mismas.

10 14. El método de la reivindicación 12, en el que la variante de Na_v1.7 humano comprende una sustitución de aminoácido seleccionada entre R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K, A1632E, o una combinación de las mismas.

15. El método de la reivindicación 12, en el que la variante de Na_v1.7 humano comprende una sustitución de aminoácido seleccionada entre F1200L, I1235L, o una combinación de las mismas.

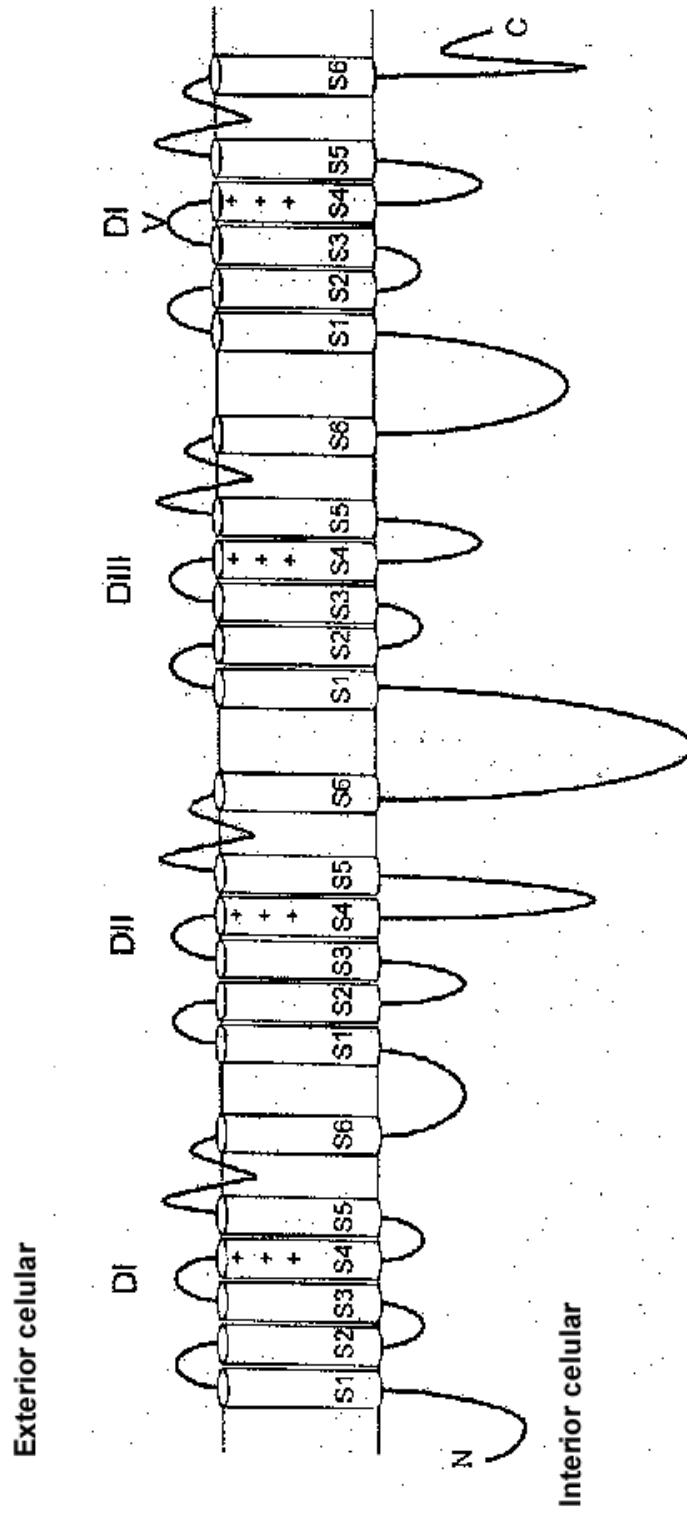


FIG. 1

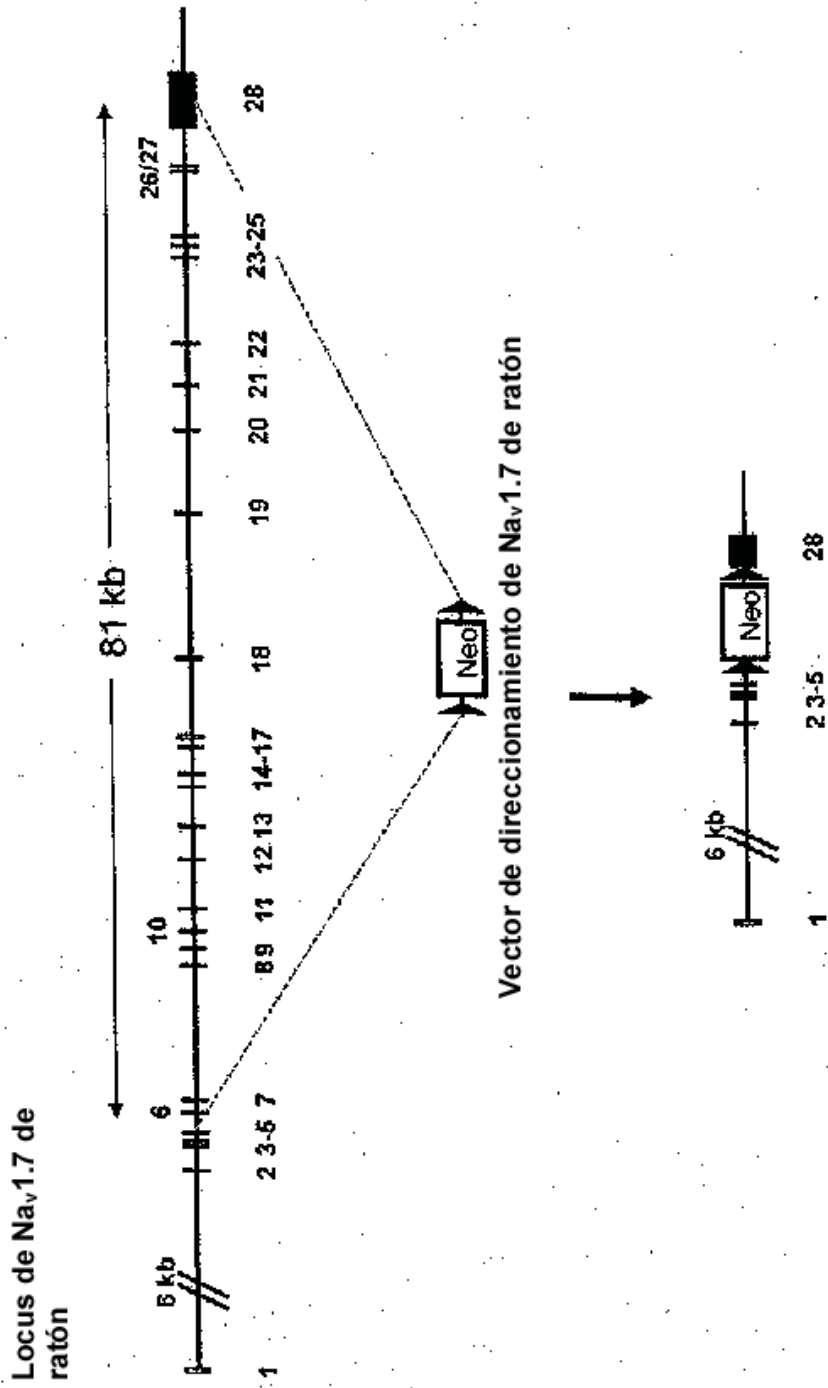


FIG. 2

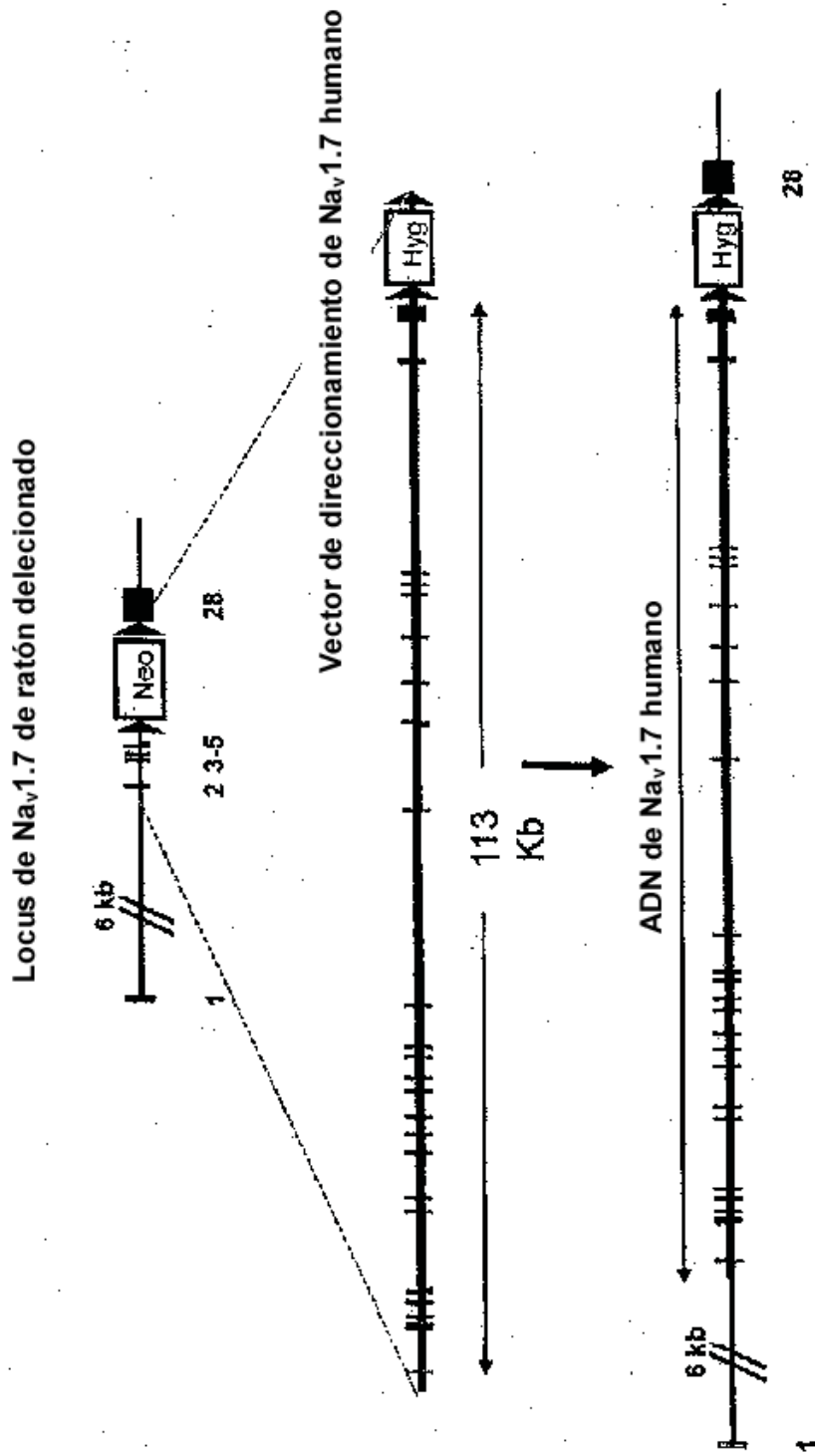


FIG. 3

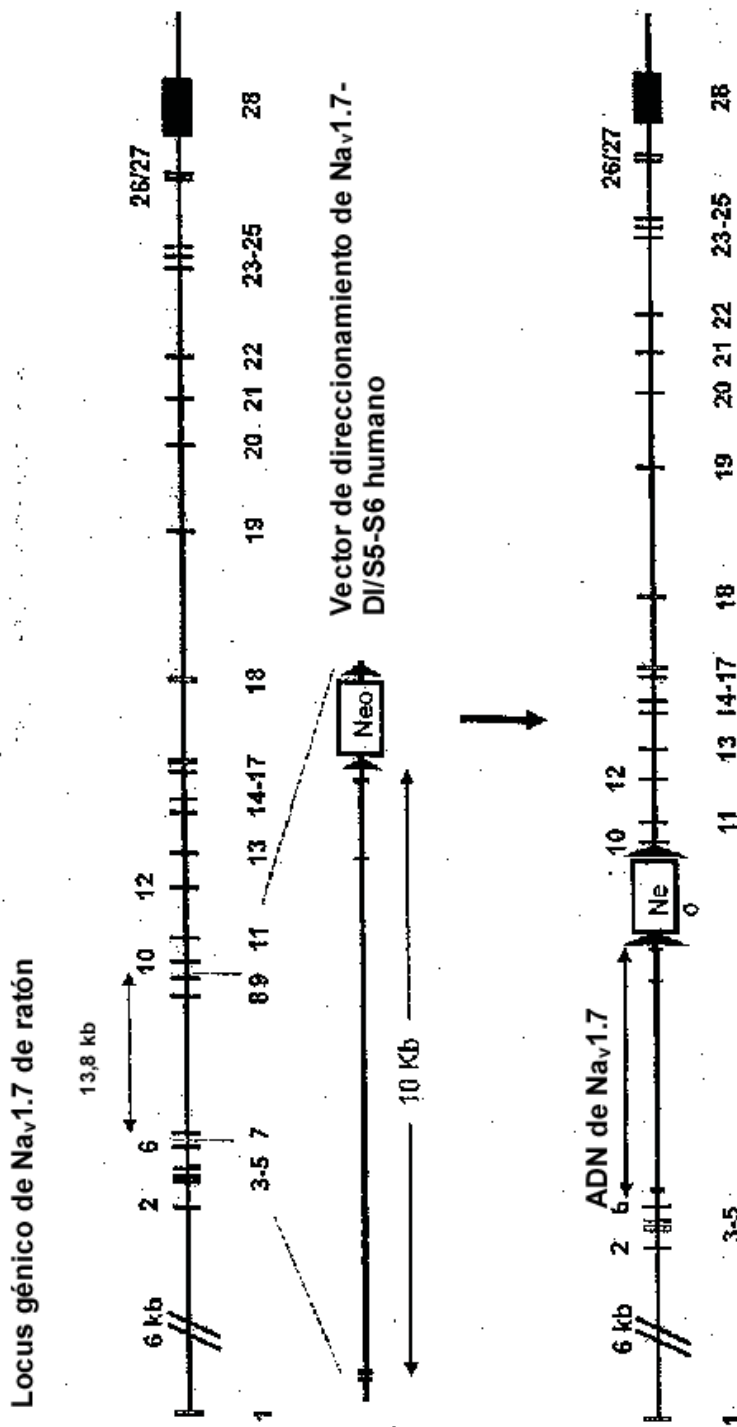


FIG. 4

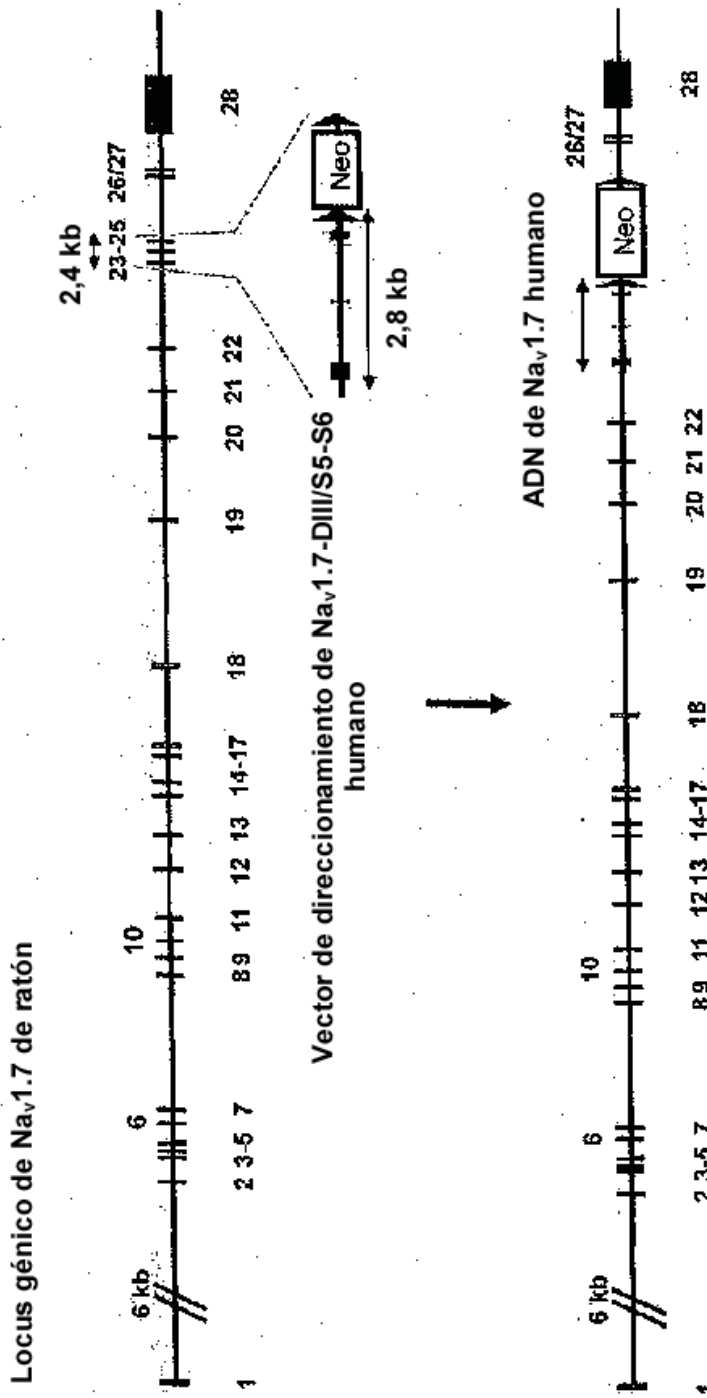


FIG. 5

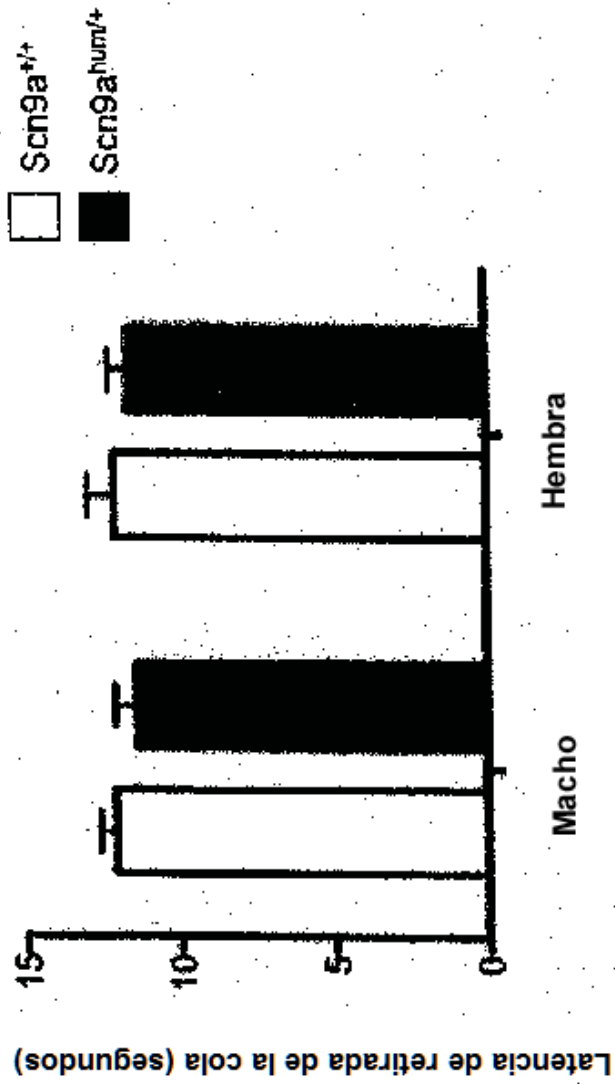


FIG. 6A

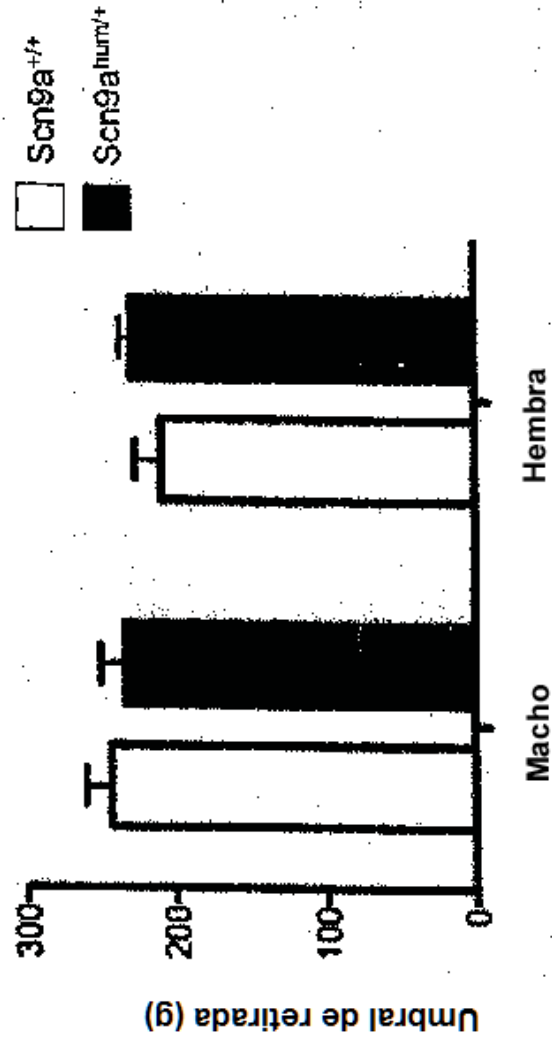


FIG. 6B

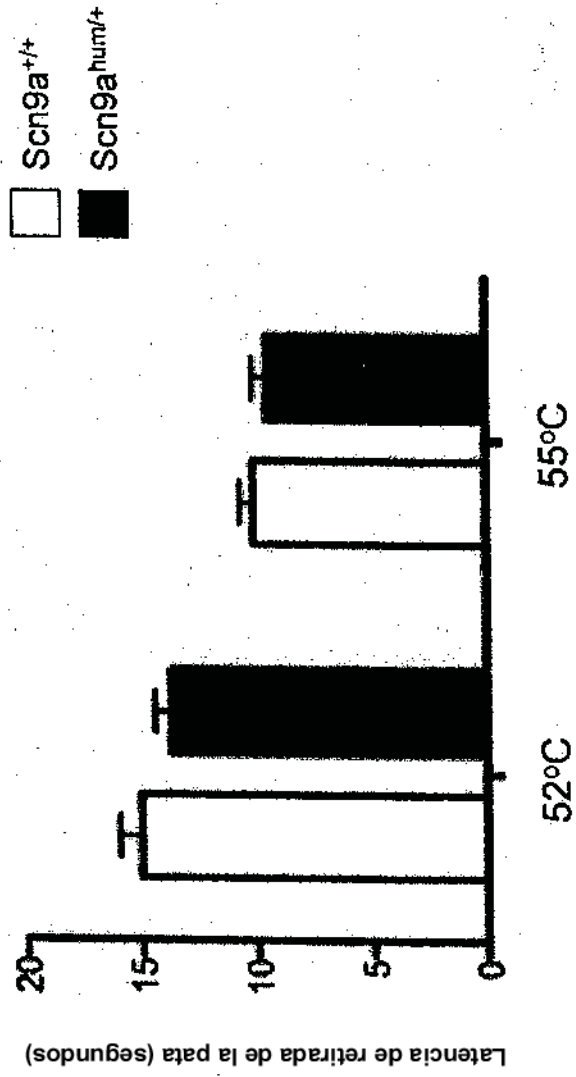


FIG. 6C

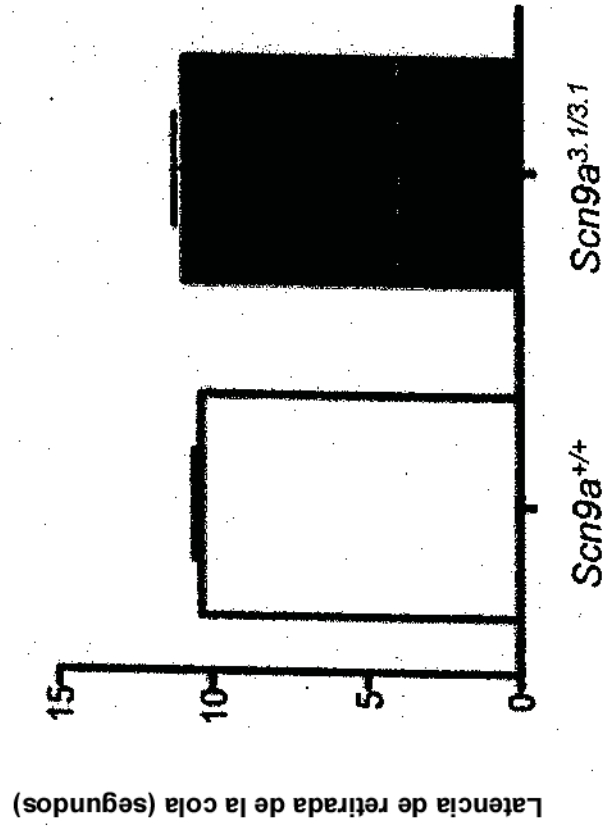


FIG. 7A

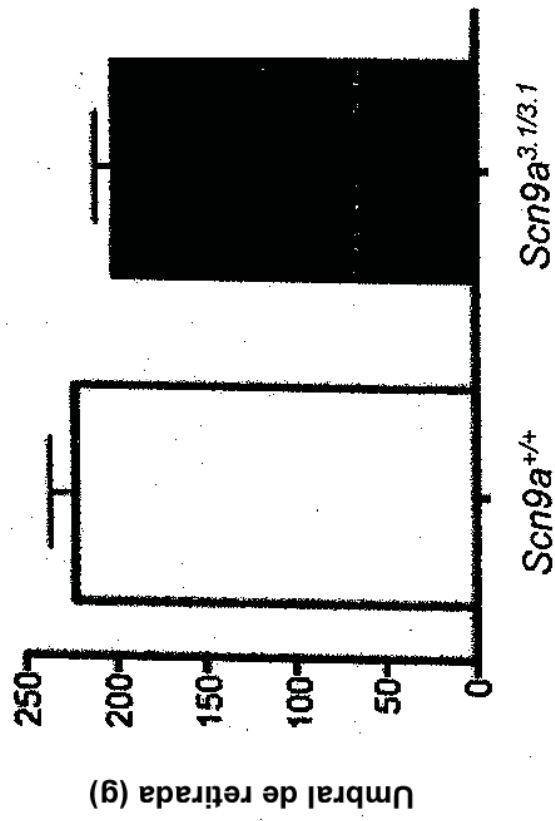


FIG. 7B

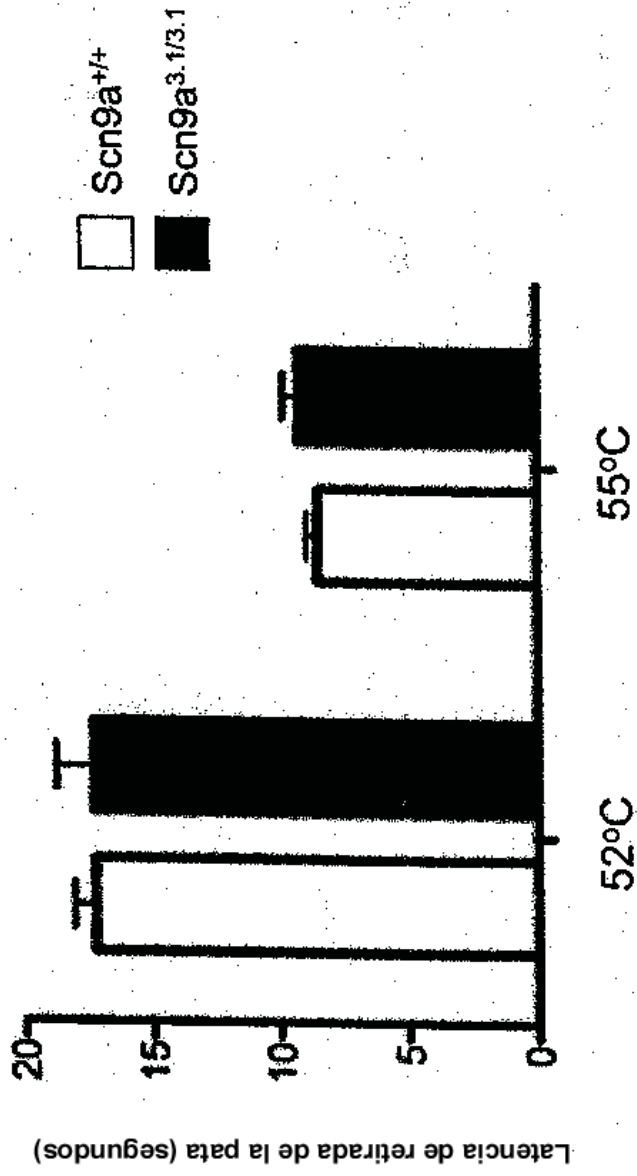


FIG. 7C

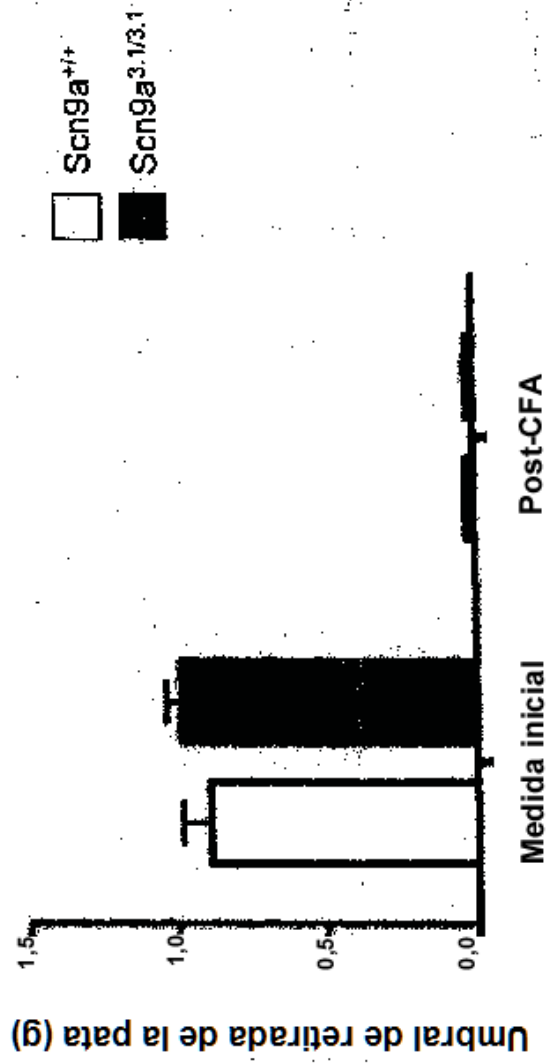


FIG. 7D

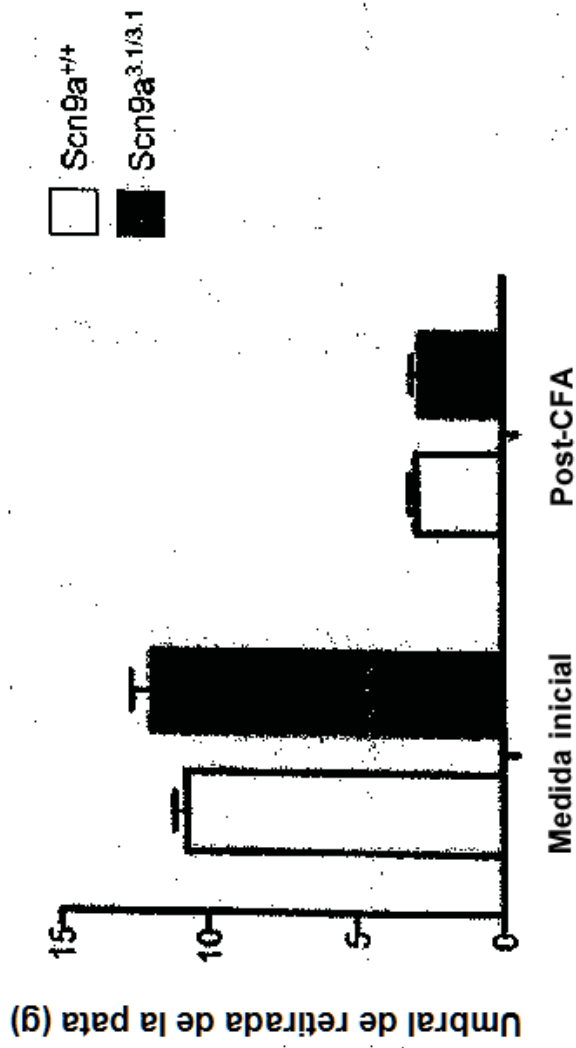


FIG. 7E

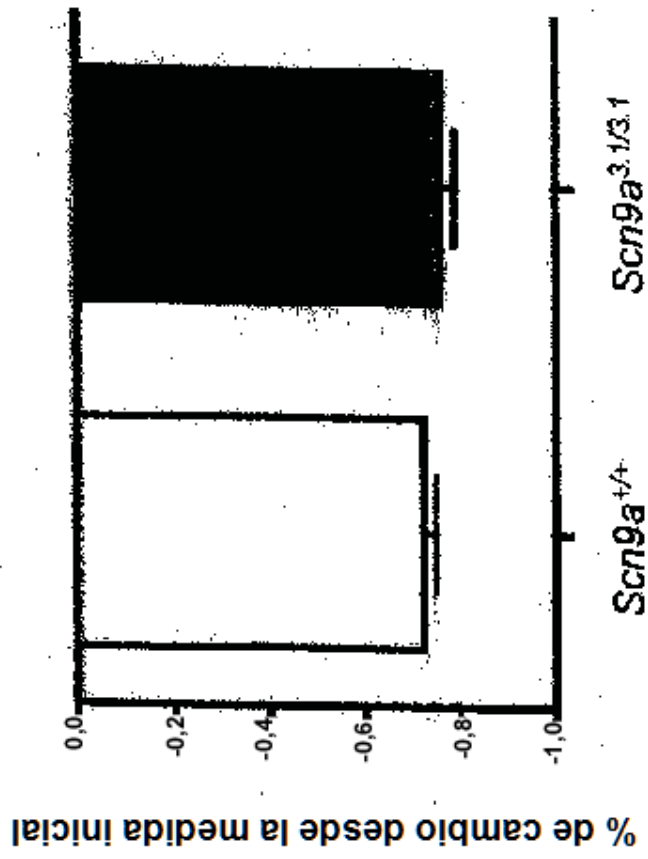


FIG. 7F

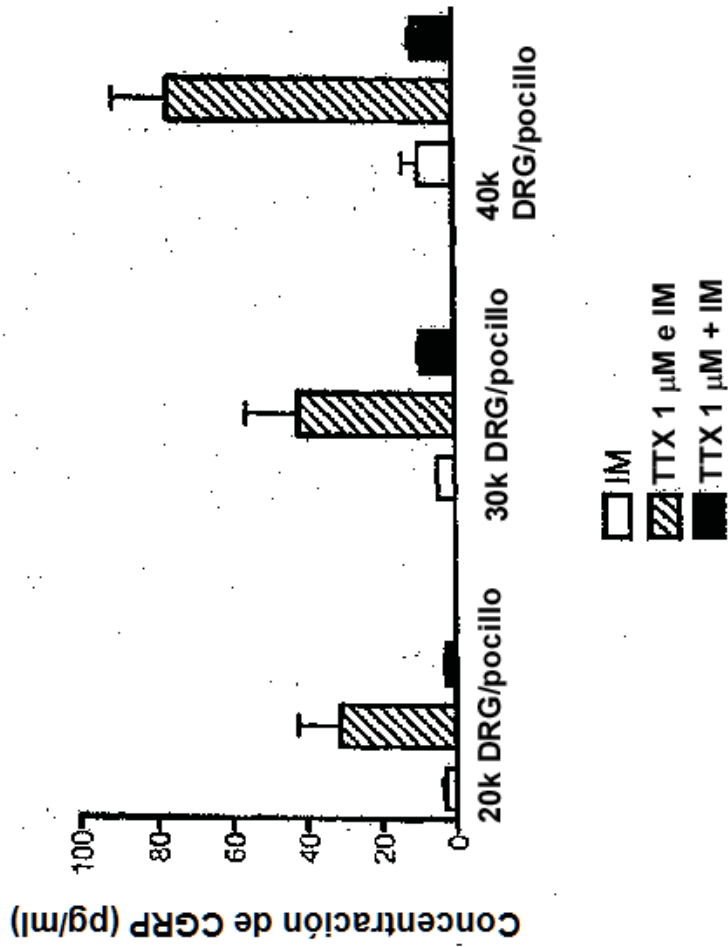


FIG. 8