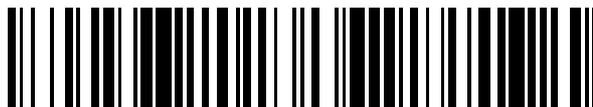


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 728**

21 Número de solicitud: 201431268

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

29.08.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.02.2016

Fecha de la concesión:

11.01.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.01.2017

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**LERMA GÓMEZ, Juan y
ALLER ALVAREZ, María Isabel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MODELO ANIMAL NO HUMANO PARA TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA,
ANSIEDAD Y/O DEPRESION**

57 Resumen:

Modelo animal no humano para trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

La invención da a conocer un modelo de animal transgénico para los trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión, que comprende de manera estable integrado en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal. Por lo tanto, la invención se refiere a un método para generar este modelo y un método para probar fármacos y fármacos candidatos para el tratamiento de trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

ES 2 561 728 B1

**MODELO ANIMAL NO HUMANO PARA DESÓRDENES DEL ESPECTRO AUTISTA,
ANSIEDAD Y/O DEPRESIÓN**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un animal transgénico no humano útil como modelo animal para trastornos del espectro autista, ansiedad y / o depresión. El animal transgénico no humano de la invención comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga integrada de manera estable que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior (prosencefalo) del animal. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo técnico del tratamiento de trastornos neurológicos, principalmente, autismo, ansiedad o depresión.

10

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos del espectro autista o ASDs (colectivamente referidos en este documento como autismo) incluyen un grupo de trastornos neuroconductuales graves y enigmáticos que generalmente se manifiestan en la infancia y persisten para toda la vida. Los ASDs comprenden un conjunto de trastornos del desarrollo que alteran la interacción social y la comunicación, causan en el afectado sentimientos y emociones inestables y, en muchos casos, afectan el desarrollo cognitivo. Los ASDs también se llaman trastornos generalizados del desarrollo, ya que no es un término que designa un tipo de trastorno del desarrollo, sino un término que designa, en un sentido amplio, enfermedades que comparten varios síntomas característicos. En los últimos años, la prevalencia de ASDs en cada país ha aumentado, y por tanto los costes sociales y económicos asociados con ASD han aumentado y la calidad de vida de la familia del paciente ha disminuido. Por esta razón, los estudios sobre el establecimiento de la causa de la ASD y el desarrollo de agentes para el tratamiento de ASD han sido cada vez más necesarios. Con respecto a la causa de ASD, se han estudiado varios factores de riesgo, y la tendencia genética, infección viral, metabolismo anormal y otros factores ambientales incluyendo métodos de crianza, típicamente han sido reconocidos como factores de riesgo y causas.

20

25

30

35

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios en modelos animales sobre la influencia de ciertos factores genéticos de ASD, y a través de estudios genéticos en

pacientes con ASD se han encontrado varios genes que se creen estrechamente relacionados con este desarreglo. Debido a que los ASDs muestran una alta heredabilidad en comparación con otros trastornos mentales, tales estudios sobre los factores genéticos del autismo son importantes para ampliar la comprensión de las causas biológicas de los ASDs y para desarrollar agentes terapéuticos eficaces contra ellos.

Los modelos animales pueden proporcionar un recurso valioso para el estudio de neuropatologías, así como para el ensayo de compuestos terapéuticos y tratamientos destinados a retardar o detener el trastorno que imitan. Debido a la complejidad genética de los trastornos del espectro autista, las cepas de ratones con una delección o mutaciones en genes relacionados con autismo se han convertido en una herramienta esencial para investigar los mecanismos moleculares y de desarrollo neurológico subyacente ASD. Los modelos disponibles de ratón para autismo se pueden encontrar en la Iniciativa Simon Foundation Autism Research Initiative (SFARI). Los genes de ASDs sindrómicos se definen como aquellos genes que predisponen al autismo en el contexto de un trastorno sindrómico. Éstos incluyen, pero no se limitan a, CNTNAP2, FMR1, MECP2, NF1, PTEN, SHANK3, TSC1/2 y UBE3A (Provenzano, G. *et al.* 2012. *Disease Markers* 33, 225-239).

Durante el desarrollo, el cerebro humano está conformado por las entradas sensoriales y experiencias cognitivas. En este período, la estructura y función de las conexiones neuronales, esenciales para el rendimiento del cerebro, pueden ser alteradas por los cambios en la configuración molecular de sus sinapsis. En el sistema glutamatérgico, por ejemplo, la hiper o hipo-actividad inducida por varios factores representa un modelo atractivo para estudiar la fisiopatología de los trastornos mentales graves. De hecho, se ha encontrado una anomalía cromosómica que altera un gen que codifica para un receptor de glutamato ionotrópico de la clase kainato en individuos con esquizofrenia y en individuos con esquizofrenia y retraso mental (Pickard, B. S. *et al.* 2012. *Human Molecular Genetics* 21, 3513–3523). Los genes que dirigen la función sináptica también parecen influir en el riesgo de autismo (Levy D. *et al.* 2011. *Neuron* 70, 886–897; Gilman, S.R. *et al.* 2011. *Neuron* 70, 898–907) y, curiosamente, algunos de ellos pertenecen a la familia de subunidades del receptor de glutamato de tipo kainato, como GRIK2 y GRIK4 (Griswold, AJ *et al.* 2012. *Molecular Genética Humana* 21, 3513 a 3523). Estudios recientes indican que las mutaciones *de novo* en la línea germinal y variantes numéricas de copia representan los factores de

riesgo más significativos para los trastornos del espectro autista de lo reconocido previamente. Éste es el caso de GRIK4, asignado a la citobanda 11q23.3-q24.1, que se encontró duplicada *de novo* en un caso de autismo (Griswold, A.J. *et al.* 2012 citado *ad supra*). Actualmente, no hay modelos animales representativos de ASD procedentes de mutaciones de línea germinal y/o variantes de número de copia.

Los trastornos de ansiedad son algunos de los trastornos psicológicos más prevalentes. La ansiedad es una emoción, conectada a la respuesta del organismo a factores estresogénicos, mientras que los factores de riesgo pueden ser evitables. Los trastornos de ansiedad se clasifican como trastornos de ansiedad no relacionados con el estrés o estrés-relacionados. Trastornos de ansiedad relacionados con el estrés incluyen el trastorno de adaptación y la respuesta de estrés agudo; trastornos de ansiedad no relacionados con el estrés son el trastorno de pánico y el trastorno de ansiedad generalizada. La ansiedad puede ser estudiada en modelos animales. Existen modelos de animales donde el rasgo de ansiedad o el estado de ansiedad ha sido inducido en laboratorio. Por ejemplo, las patentes US6,353,152 y US6,060,642 representan modelos animales para la ansiedad. Sin embargo, los modelos animales descritos en dichas patentes alcanzan un bajo grado de ansiedad y no imitan los episodios agudos de la ansiedad en seres humanos.

En vista de lo anterior, existe una necesidad en el estado de la técnica de proporcionar nuevos modelos animales no humanos para los trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión que representan los múltiples fenotipos de estos trastornos en seres humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a un animal transgénico no humano que puede ser utilizado como un modelo animal no humano para el estudio de los trastornos del espectro del autismo, ansiedad y/o depresión. Dicho animal transgénico se caracteriza porque comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 integrada de manera estable, en donde dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal transgénico. Como consecuencia, el nivel de proteína GluK4 en el animal transgénico (el nivel resultante de la suma de los niveles de proteína GluK4 homóloga y heteróloga) se incrementa con respecto al nivel de dicha proteína en el animal no transgénico.

Los ratones que expresan GluK4 de la presente invención se generaron mediante la introducción de 5 copias de la etiqueta Myc en fase con el codón de inicio de GRIK4 y bajo el control del promotor de CaMKII. A continuación, las consecuencias fisiológicas y conductuales de la sobre-expresión del gen GRIK4 en el cerebro anterior del ratón fueron evaluadas utilizando una batería de pruebas electrofisiológicas y comportamentales. Como puede verse en el Ejemplo 1, los resultados obtenidos mostraron que el modelo animal transgénico generado reproduce algunos endofenotipos observados en el autismo, imitando la situación en los seres humanos con ASD.

En base a este descubrimiento, los inventores han desarrollado varios aspectos inventivos que se describen en detalle a continuación.

El animal transgénico no humano de la invención

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un animal transgénico no humano que comprende integrada de forma estable en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal (en lo sucesivo, "animal no humano de la invención").

La expresión "integrado de forma estable en su genoma" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está, bien integrado en un cromosoma comprendido en una célula

o en un animal, por ejemplo, en un cromosoma endógeno o como parte de un cromosoma artificial, o está presente en una forma extracromosómica que no se diluya o pierda durante las divisiones celulares durante el tiempo de vida de la célula. Por ejemplo, un vector viral que no se integra en el genoma de una célula huésped, tal como un vector adenoviral, se conoce como integrado de forma estable en el genoma de una célula, si la célula es una célula que no se divide, tal como una neurona post-mitótica. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 se integra en un cromosoma del animal no humano de la invención y no se diluye o pierde durante el tiempo de vida de la célula. Los descendientes de estas células transfectadas, por lo tanto, también expresan el nuevo gen, resultando en una línea celular transfectada de manera estable.

El término "heterólogo" se refiere a un gen o parte de un gen en un organismo huésped que se deriva de una especie diferente que el organismo huésped. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 es una secuencia de nucleótidos exógena con respecto al animal transgénico no humano. Dicho gen que deriva de una especie diferente de la célula huésped/animal también puede ser llamado "transgén".

La proteína GluK4 es un subtipo de receptor de kainato perteneciente a la familia de canales iónicos activados por ligando que está codificada por el gen GRIK4. Se puede utilizar una secuencia nucleotídica que codifica cualquier proteína GluK4 en el contexto de la presente invención. Ejemplos de proteínas GluK4 incluyen, pero no se limitan a, la proteína GluK4 de rata (*Rattus norvegicus*), la proteína GluK4 humana (*Homo sapiens*), la proteína GluK4 de ratón (*Mus musculus*), la proteína GluK4 de la rata topo (*Nannospalax galili*), la proteína GluK4 de caballo (*Equus przewalskii*), la proteína GluK4 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), la proteína GluK4 de hámster chino (*Cricetulus griseus*) y la proteína GluK4 de chimpancé común (*Pan troglodytes*). En una realización particular, la proteína GluK4 es la proteína GluK4 de rata.

Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas están disponibles en bases de datos públicas y se pueden recuperar fácilmente por el experto en el estado de la técnica. Sin embargo, los ejemplos de secuencias de aminoácidos de las proteínas GluK4 incluyen, pero no se limitan a, la proteína GluK4 de *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO: 1, número de acceso NCBI NP_036704 versión NP_036704.1 GI: 10242377), la

proteína GluK4 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 3, NCBI número de acceso AAI46653.1 versión AAI46653.1 GI: 148921519), la proteína GluK4 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 4, NCBI número de acceso Q8BMF5, versión Q8BMF5.2 GI: 341940775), la proteína GluK4 de *Nannospalax galili* (SEQ ID NO : 5, NCBI número de acceso XP_008824232, Versión XP_008824232.1 GI: 674105958), la proteína GluK4 de *Equus przewalskii* (SEQ ID NO: 6, NCBI número de acceso XP_008511947, versión XP_008511947.1 GI: 664709971), la proteína GluK4 de *Oryctolagus cuniculus* (SEQ ID NO : 7, NCBI número de acceso XP_008258709.1, versión XP_008258709.1 GI: 655601372), la proteína GLUK4 de *Cricetulus griseus* (SEQ ID NO: 8, NCBI número de acceso XP_007631296, versión XP_007631296.1 GI: 625279300), y la proteína GluK4 de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO : 9, NCBI número de acceso Q5IS46, GI versión Q5IS46.1: 61213662). En otra realización particular, la proteína GluK4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Se debe destacar que la invención no se limita a estas secuencias específicas y que secuencias de proteínas GluK4 adicionales son conocidas en el estado de la técnica.

En vista de lo anterior, la persona experta en la técnica entiende que la proteína GluK4 para ser utilizada en la presente invención se puede derivar de varias fuentes, siendo dichas proteínas variantes funcionalmente equivalentes de cada uno. Así, en el contexto de la presente invención también se contempla variantes funcionalmente equivalentes de la SEQ ID NO: 1. El término "variante funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1" se refiere a una proteína (o polipéptido) que comprende una o más alteraciones, tales como sustituciones, inserciones, deleciones y/o truncamientos de uno o más residuos de aminoácidos específicos en una o más posiciones específicas en la proteína, y que tiene la misma función que la SEQ ID NO: 1, es decir, pertenece a la familia de receptores de glutamato, mediando la transmisión sináptica excitatoria. Un ensayo para evaluar si la proteína es una variante funcionalmente equivalente de la SEQ ID NO: 1 es, por ejemplo, el ensayo que se describe en los Ejemplos de la solicitud de patente y que comprende la medición de la KAR mediada por las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC_{KAR}) en el animal transgénico no-humano que comprende la variante. También sería posible para probar la funcionalidad de la proteína mediante la realización de un ensayo como el descrito en la figura 1b, en donde la secuencia de nucleótidos exógena se ha expresado en células HEK293 junto con un plásmido que codifica subunidades GluK2, donde la corriente sólo podría ser inducida por el agonista ATPA siempre que el producto de dicha secuencia de nucleótidos heteromericamente con subunidades GluK2 para formar receptores funcionales.

Por lo tanto, las variantes de la proteína GluK4 pueden ser (i) una en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, (ii) una en el que hay uno o más residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, los residuos que son modificados por la unión de grupos sustituyentes, (iii) una en la que la proteína es una variante de procesamiento (splice-variant) de las proteínas de la presente y/o (iv) fragmentos de las proteínas invención. Los fragmentos incluyen proteínas generadas a través de la escisión proteolítica (proteólisis incluyendo multi-sitio) de una secuencia original. Las variantes se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de la enseñanza en el presente documento.

Por lo tanto, en una realización particular, la proteína GluK4 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 95, 96, 97, 98 ó 99% a la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, la proteína GluK4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En el contexto de la presente invención, el término "identidad de secuencia" se refiere a la homología entre dos secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos se dice que son homólogas al exhibir un cierto nivel de similitud. Si dos secuencias homólogas están estrechamente relacionadas o más alejadas se indica con "porcentaje de identidad" o "porcentaje de similitud", que es alta o baja, respectivamente. Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una proteína a una secuencia de una segunda proteína. El grado de identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos por las personas expertas en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente mediante el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas GluK4 mencionadas anteriormente pueden obtenerse de bases de datos públicas, tales como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Sin embargo, en una realización

particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO. 2 (*Rattus norvegicus*, NCBI número de acceso NM_012572, versión NM_012572.1 GI: 10242376).

5 Una de las características del animal no humano de la invención es que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 se expresa en el cerebro anterior del animal.

10 El término "cerebro anterior", también llamado prosencéfalo, se refiere a la parte anterior de las tres divisiones principales del cerebro de los vertebrados en desarrollo. El cerebro anterior es la parte más grande del cerebro, la mayor parte del mismo está formada por la corteza cerebral. Otras estructuras importantes que se encuentran en el cerebro anterior incluyen el tálamo, el hipotálamo y el sistema límbico (una colección de estructuras dentro del cerebro anterior, incluyendo la amígdala y el
15 hipocampo).

Por lo tanto, en una realización particular, la secuencia de nucleótidos se expresa en el hipocampo y/o en el neocórtex.

20 El término "hipocampo" se refiere a la parte del cerebro que está implicada en la formación, organización y almacenamiento de la memoria. Se encuentra debajo de la corteza cerebral; y en los primates se encuentra en el lóbulo temporal medial, debajo de la superficie cortical. Contiene dos partes principales entrelazadas: el cuerno de Amón y el giro dentado.

25 El término "neocórtex" o "neocorteza" se refiere a la mayor parte de la corteza cerebral, que abarca los dos hemisferios cerebrales, formadas por seis capas, etiquetadas desde el exterior, I a VI.

30 Cualquier método conocido en el estado de la técnica para crear animales transgénicos se puede utilizar para obtener el animal transgénico no humano de la invención. Éstos se darán a conocer en detalle más adelante en otros aspectos de la invención.

35 Como la persona experta entenderá, la secuencia de nucleótidos tiene que estar unida a una secuencia reguladora de la expresión que controle la transcripción de dicha

secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, en otra realización particular, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 está unida operativamente a una secuencia reguladora de la expresión. Una secuencia reguladora de la expresión es un segmento de una molécula de ácido nucleico que se refiere a una secuencia promotora o una secuencia aguas arriba (*upstream*) (tal como un promotor), en la que la activación de los mismos regula (aumentando o disminuyendo) la transcripción de una secuencia de ácido nucleico unida de manera operativa a la misma. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "operativamente unida" significa que el polinucleótido está dentro de la pauta de lectura correcta para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias nucleares que promueven o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias que regulan el aumento de la expresión del polinucleótido. En otra forma de realización más particular, la secuencia reguladora de la expresión es un promotor y/o un potenciador.

El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante del polinucleótido, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor CAGS, un promotor de ubiquitina-C, y similares. Un gran número de otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la aplicación de la invención. Si se desea la expresión controlada del polinucleótido, entonces se debe utilizar un promotor inducible. El nivel de expresión con frecuencia puede ser controlado variando la concentración del inductor de modo que el promotor inducible se estimula más fuertemente o débilmente y, por consiguiente, la concentración del producto transcrito del polinucleótido se ve afectada. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor sensible a andrógenos o estrógenos, un promotor sensible a la doxiciclina, un promotor de metalotioneína, o un promotor de respuesta a ecdisona. Otros ejemplos son bien conocidos en la técnica y pueden ser utilizados para implementar la invención. Además, puede desearse una expresión específica de la secuencia de nucleótidos de interés. En este caso, se pueden utilizar en la presente invención un promotor específico del tipo de célula o un promotor específico del tejido. Por ejemplo, el promotor puede ser específico de células neuronales, específico del cerebro, específico de las neuronas, o específico de células gliales, por ejemplo, el promotor tau, el promotor de la CaMK, el promotor de la Nestina, el promotor GFP, el promotor de la Tubulina III, u otro promotor conocido

por los expertos en la técnica por ser activo específicamente en una de estas células de los tejidos. Por lo tanto, en una realización particular, el promotor es un promotor específico del Sistema Nervioso Central, tales como el promotor de la Enolasa Específica de Neuronas (NSE). En una realización particular, el promotor es el
5 promotor de CaMKII alfa o el promotor del gen GRIK4

Como se mencionó anteriormente, el animal transgénico no humano de la invención se caracteriza porque comprende integrada de manera estable en su genoma una
10 secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal transgénico. Como consecuencia, el nivel de proteína GluK4 en el animal transgénico (el nivel resultante de la suma de los niveles de proteína GluK4 homólogas y heterólogas) se incrementa con respecto al nivel de dicha proteína en el animal no transgénico. La presencia de un aumento de los niveles de la proteína GluK4 en el animal puede ser
15 debido a la presencia en el genoma de más de una copia de la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4. Por lo tanto, en otra realización particular, el animal transgénico no humano de la invención comprende al menos 2, 3 o 4 copias de la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4.

20 Cualquier animal no humano puede ser utilizado para expresar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 en su genoma, obteniendo el animal transgénico no humano de la invención. Ejemplos de animal no humano incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, preferiblemente, roedores (ratón, rata, conejillo de indias, rata-topo, etc), primates no humanos, tales como monos o chimpancés. Por lo tanto,
25 en otra realización particular, el animal transgénico no humano de la invención es un mamífero, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en mono, cerdo, rata y ratón.

El animal no humano transgénico de la invención puede tener cualquier fondo
30 genético de los conocidos en el estado de la técnica por un experto en la técnica, es decir, dicho animal transgénico no humano puede venir de un animal de tipo salvaje (WT) o de un animal no humano con un fondo genético incorporando cualquier marcador molecular que está directa o indirectamente relacionado con el autismo, ansiedad o depresión.

35

Usos del animal transgénico no humano de la invención

Como se explicó anteriormente, el animal transgénico no humano se caracteriza porque comprende una proteína heteróloga secuencia de nucleótidos que codifica de manera estable GluK4 insertado en su genoma, causando un aumento en los niveles de proteína GluK4. Sorprendentemente, esto origina que el comportamiento de los animales transgénicos imite los síntomas humanos de ASD, la depresión y/o ansiedad. En consecuencia, el animal transgénico no humano de la invención es útil como un modelo animal no humano de dichas enfermedades.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del animal transgénico no humano de la invención como un modelo animal para trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

La invención se dirige al uso de un animal transgénico no humano de la invención para la detección, descubrimiento, la identificación, evaluación y validación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento y/o prevención de ASD, la depresión y/o ansiedad.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para la detección, descubrimiento, identificación, evaluación y/o validar un compuesto para el tratamiento del ASD, la ansiedad y/o depresión, en adelante procedimiento de la invención, que comprende:

- (a) administrar un compuesto candidato a un animal transgénico no humano de la invención y
- (b) determinar el efecto del compuesto candidato en el comportamiento de dicho animal transgénico no humano, o alternativamente, la determinación del nivel de expresión de la proteína GluK4.

Tal y como se utiliza en este documento, los términos "autismo" y "trastornos del espectro autista" (ASDs) se utilizan indistintamente para describir en general tres de los cinco trastornos del desarrollo que se describen en el Manual Diagnóstico y Estadístico IV (DSM IV-TR): trastorno autista, trastorno de Asperger y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (American Psychiatric Association, 2000). Las características clínicas del autismo incluyen alteraciones en tres categorías de interacciones de comportamiento recíproco sociales, comunicación verbal y no verbal, y actividades propias de su edad e intereses.

Tal y como se usa aquí, el término "ansiedad" se refiere a un miedo a un objeto no definido, es decir, una reacción emocional ofensiva y agonizante que tenemos en una situación amenazante y peligrosa que puede resultar en resultados negativos. El término "trastornos de ansiedad" se refiere a un trastorno mental en el que surge la ansiedad sin razón y un nivel de ansiedad es demasiado alto. Es decir, este término se refiere a un caso en el que se plantea la excesiva angustia psicológica debido a la ansiedad mórbida o dificultad grave y que se produce en la adaptación a la vida real. Ejemplos de trastornos de ansiedad incluyen, pero no se limitan a, un trastorno de pánico, fobia, un trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno de estrés postraumático, trastorno de estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizada, y un trastorno de ansiedad por separación.

Un "trastorno de pánico" es un síntoma de ansiedad extrema en la que el miedo surge de repente y sin ningún motivo, seguido de sofoco o de fuertes latidos del corazón. Es decir, el trastorno de pánico es un trastorno que tiene varios sucesos de ataque de pánico y que pueden ocurrir debido a una fatiga, excitación, comportamientos sexuales, o impactos emocionales. Sin embargo, por lo general, el trastorno de pánico, no puede predecirse y ocurre de repente.

La "fobia" se refiere a un trastorno de ansiedad caracterizado por evitar una situación en particular o sujeto debido a la ansiedad y el miedo de la situación en particular o tema grave. 1) La fobia específica es un trastorno caracterizado por un miedo irracional recurrente y conductas de evitación de un tema o situación particular. 2) La fobia social es un trastorno que se caracteriza por mostrar repetidamente conductas evasivas por miedo a una situación social donde se produce la interacción entre las personas. 3) La agorafobia es un trastorno que se caracteriza por mostrar en varias ocasiones el temor de un lugar o situación en particular.

El "trastorno obsesivo-compulsivo" es un trastorno de ansiedad caracterizado por pensamientos recurrentes no deseados, es decir obsesiones y comportamientos.

El "trastorno de estrés postraumático" es un trastorno de ansiedad caracterizado por una ansiedad persistente en respuesta a un suceso aterrador.

El "trastorno de estrés agudo" es un trastorno de ansiedad que muestra síntomas similares a los del trastorno de estrés postraumático y que se caracteriza por mostrar síntomas disociativos en respuesta a un evento traumático.

5 El "trastorno de ansiedad generalizada" es un trastorno de ansiedad caracterizado por la ansiedad crónica y preocupación excesiva con respecto a varias situaciones.

10 El "trastorno de ansiedad por separación" es una condición en la que un individuo experimenta ansiedad excesiva respecto a la separación de las personas a las que el individuo tiene un fuerte apego emocional. Si la ansiedad por separación excede de un rango normal e interfiere con una vida social normal, esto se puede definir como un estado mórbido. A este respecto, el trastorno de ansiedad de separación se refiere a un caso en el que la ansiedad por separación es excesiva y por lo tanto interfiere con las actividades normales.

15

Como se usa en este documento, el término "depresión" se refiere a un trastorno del cerebro que comprende los sentimientos y síntomas en un individuo que interfieren con su capacidad para trabajar, dormir, estudiar, comer y disfrutar de la vida. Los ejemplos de trastornos depresivos incluyen, pero no se limitan a, el trastorno depresivo mayor persistente [tal como la depresión psicótica, la depresión posparto, el trastorno afectivo estacional (SAD)] y el trastorno bipolar.

20

El término "depresión mayor" se refiere a los síntomas severos que interfieren con la capacidad para trabajar, dormir, estudiar, comer y disfrutar de la vida. Un episodio puede ocurrir sólo una vez en la vida de una persona, pero más a menudo, una persona tiene varios episodios.

25

El término "trastorno depresivo persistente" se refiere a un estado de ánimo depresivo que dura por lo menos 2 años. Algunas formas de depresión son ligeramente diferentes, o pueden desarrollarse bajo circunstancias únicas. Estas incluyen, pero no se limitan a:

30

- La depresión psicótica, que se produce cuando una persona sufre una depresión grave más alguna forma de psicosis, como tener creencias falsas perturbadoras o una ruptura con la realidad (delirios) o ver o escuchar cosas perturbadoras que otros no pueden oír o ver (alucinaciones).

35

- La depresión postparto, que es mucho más grave que los "baby blues" que experimentan muchas mujeres después de dar a luz, cuando los cambios hormonales y físicos y la nueva responsabilidad de cuidar a un recién nacido puede ser abrumador. Se estima que del 10 al 15 por ciento de las mujeres experimentan depresión posparto después de dar a luz.
- El trastorno afectivo estacional (SAD), que se caracteriza por la aparición de la depresión durante los meses de invierno, cuando hay menos luz solar natural. La depresión generalmente se levanta durante la primavera y el verano. El SAD se puede tratar efectivamente con terapia de luz, pero casi la mitad de las personas con SAD no mejoran con la terapia de luz sola. Los medicamentos antidepresivos y la psicoterapia pueden reducir los síntomas del SAD, ya sea solo o en combinación con terapia de luz.

El término "trastorno bipolar", también llamado enfermedad maníaco-depresiva, se refiere a los cambios de humor, el ciclismo en el individuo desde los máximos extremos (por ejemplo, manía) a bajas extremas (por ejemplo, depresión).

En un primer paso, el método de la invención comprende administrar un compuesto candidato a un animal transgénico no humano de la invención.

Los compuestos candidatos o bajo ensayo pueden ser compuestos de cualquier naturaleza, por ejemplo, un producto químico, biológico, microbiológico, etc compuestos aislados o mezclados con uno o más compuestos diferentes, e incluyen compuestos con una composición y estructura conocida o desconocida, productos farmacéuticos con cualquier aplicación terapéutica conocida, productos biológicos, productos microbiológicos, etc., por ejemplo, compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, extractos, etc.

En un segundo paso, el método de la invención comprende determinar el efecto del compuesto candidato en el comportamiento de dicho animal transgénico no humano.

En el animal transgénico no humano de la invención se reproducen algunos endofenotipos vistos en el autismo, ansiedad y/o depresión, por ejemplo, un comportamiento social deteriorado, un déficit en su interacción social, menor actividad que en los animales no transgénicos, la falta de motivación (aumento de períodos sedentarios), anhedonia, comportamiento repetitivo, comunicación defectuosa (por

ejemplo, la vocalización), etc.; si después de administrar el compuesto candidato al animal transgénico no humano de la invención, el animal cambia uno o más de los mencionados endofenotipos a comportamientos con más interacción social, aumento de la actividad, periodos menos sedentarios, etc; entonces se puede concluir que el compuesto candidato es útil para tratar trastornos del espectro autista, ansiedad y / o depresión.

El término "tratamiento" o "tratar" se refieren a mejorar, atenuar, disminuir o eliminar uno o más de los síntomas de trastornos del espectro autista, la ansiedad y/o la depresión. Por tanto, en el contexto de la presente invención, se considera que un compuesto es útil para tratar trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión cuando uno o más de los síntomas asociados a dichos trastornos se mejora, atenuada, disminuida o eliminada (debido a la administración al sujeto de dicha composición).

El cambio en el comportamiento del animal transgénico no humano de la invención después de administrar el compuesto objeto de ensayo se puede evaluar mediante el uso de una batería de pruebas de comportamiento. Dichas pruebas son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y en la práctica de rutina para la persona experta en la técnica. Cualquiera de ellas puede ser utilizada en el contexto de la presente invención. Las pruebas de comportamiento incluyen, pero no se limitan a, test de interacción social de las tres cámaras, prueba de natación forzada, laberinto elevado en cruz, ensayo en campo abierto y la caja de luz-oscuridad.

Alternativamente, el segundo paso del método de la invención puede comprender determinar el nivel de expresión de la proteína GluK4. Como se explicó anteriormente, el animal transgénico no humano de la invención se caracteriza porque comprende integrado de manera estable en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 y, como consecuencia, el nivel de proteína GluK4 en el animal transgénico (el nivel resultante de la suma de los niveles de proteína GluK4 homólogas y heterólogas) se incrementa con respecto al nivel de dicha proteína en el animal no transgénico. En el contexto de la presente invención, el término "homólogo" es equivalente al término "endógeno" y ambos se refieren a la proteína GluK4 expresada de forma natural por el animal.

35

Por lo tanto, si después de administrar el compuesto candidato al animal transgénico no humano de la invención, el nivel de proteína GluK4 en el animal (el nivel resultante de la suma de los niveles de proteína GluK4 homólogas y heterólogas) es menor que el nivel de proteína en GluK4 el animal no transgénico equivalente, es indicativo de que el compuesto candidato es útil para tratar trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

Los métodos para determinar los niveles de proteína en una muestra biológica son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y son práctica de rutina para un experto.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del animal transgénico no humano de la invención en el cribado, descubrimiento, identificación, evaluación y/o validación de un compuesto o terapia para tratar trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

Por otro lado, el animal transgénico no humano de la invención, por ejemplo, un ratón, puede, además, ser utilizado mediante su cruzamiento con otros animales no humanos de la misma especie para obtener animales no humanos que tienen el genotipo y el fenotipo característicos de sus progenitores. Los ejemplos de animales no humanos que se pueden cruzar con el animal no humano de la invención incluyen: animales no humanos *knock-out* para el gen GRIK4, u otros genes directa o indirectamente relacionados con ASDs, ansiedad y/o depresión; animales no humanos que expresan variaciones alélicas, polimorfismos o mutaciones en genes implicados en ASDs, la ansiedad y/o la depresión, o de otros animales no humanos que pueden ser utilizados como modelos animales de ASDs, ansiedad y/o depresión.

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, también se contempla la progeñe, la descendencia o descendientes del animal transgénico no humano de la invención.

Métodos para producir el animal transgénico no humano de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producción de un modelo animal no humano de autismo que comprende la expresión en el cerebro anterior de un animal no humano una secuencia heteróloga de nucleótidos que codifica la

proteína GluK4, en el que la secuencia heteróloga de nucleótidos se integra de forma estable en el genoma del animal no humano.

5 Los métodos para expresar genes en animales no humanos son ampliamente conocidos por la persona experta en la técnica. Por ejemplo, el gen de interés (en la presente invención la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 o transgén) puede ser introducido en el animal no humano mediante el uso de un vector que comprende el gen de interés unido operativamente a una secuencia reguladora, lo que aumenta la expresión del mismo.

10

En una realización particular, el gen de interés codifica la proteína GluK4 que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% con la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, el gen de interés que codifica la proteína GluK4 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 En otra realización particular, la proteína GluK4 es la proteína GluK4 de rata.

15

En otra realización particular, la secuencia reguladora es un promotor y/o un potenciador (enhancer), preferiblemente, el promotor es un promotor específico del Sistema Nervioso Central, más preferiblemente, el promotor es el promotor de CaMKII alfa o el promotor del gen GRIK4. En otra realización particular, la expresión comprende la introducción de al menos 2, 3 ó 4 copias de la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 en el genoma del animal no humano. Por lo tanto, el vector comprende 2, 3 ó 4 copias del transgén. Todas estas realizaciones particulares se han descrito en los párrafos anteriores.

20

25

A continuación, el vector puede introducirse en la célula huésped deseada mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, transformación, transducción, electroporación, infección, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, LIPOFECTINA (TM) (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD.), fusión de liposomas, lípidos catiónicos sintéticos, uso de una pistola génica o vector transportador de ADN, de tal manera que el transgén se transmite a la descendencia de la línea. Las realizaciones particularmente preferidas de la invención abarcan los métodos de introducción del vector que contiene el transgén mediante inyección pronuclear de un transgénico construir en el mononúcleo de un embrión de ratón y la infección con un vector viral

30

35

que comprende el transgén. En realizaciones preferidas, un vector que contiene el transgén se introduce en cualquier material genético nucleico que finalmente forma parte del núcleo del cigoto del animal que se hará transgénico, incluyendo el núcleo del cigoto. En una realización, el transgén puede ser introducido en el núcleo de una
5 célula germinal primordial que es diploide, por ejemplo, una espermatogonia o un oogonio.

Cuando se desarrolla una transfección estable, los investigadores utilizan marcadores de selección para distinguir las transfecciones transitorias de las estables. La co-
10 expresión de un marcador con el gen de interés permite a los investigadores identificar y seleccionar las células que tienen el nuevo gen integrado en su genoma mientras que también se selecciona contra las células transfectadas transitoriamente. La eficiencia de la integración depende de la técnica de transfección y del vector empleado. Con el fin de identificar y seleccionar células integradoras, un gen que
15 codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con la secuencia del gen de interés, por ejemplo, la secuencia del gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido
20 nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán). Tales métodos son particularmente útiles en métodos que implican la recombinación homóloga en células de mamífero (por ejemplo, en células madre embrionarias murinas) antes de la introducción de las células recombinantes en
25 embriones de ratón para generar quimeras.

Puede utilizarse un gran número de sistemas de selección para seleccionar células huésped transformadas. En particular, el vector puede contener ciertos marcadores detectables o seleccionables. Otros métodos de selección incluyen, pero no se limitan
30 a seleccionar para otro marcador tal como: genes del virus herpes simplex timidina quinasa, de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, y de adenina fosforribosiltransferasa que se pueden emplear en células tk, hgprt o aprt células, respectivamente. También, la resistencia a antimetabolitos se puede usar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato;
35 gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al

aminoglicósido G-418; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al, 1984, Gene 30: 147).

5 Los animales no humanos transgénicos de la invención pueden obtenerse por cualquier método de transgénesis conocido por la persona experta en la técnica que comprende introducir el vector anteriormente descrita en el genoma de la célula, tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas, transformación celular seguido por clonación (los núcleos de las células transformadas con éxito se transfieren a óvulos enucleados y se implantan en hembras receptoras), la
10 transformación de gametos (introducir genes en oocitos o espermatoцитos y el uso de los gametos transformados para la fecundación, generando un animal completo) y/o microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

15 En una realización particular del método, la secuencia de nucleótidos se expresa en el hipocampo y/o en el neocórtex.

En otra realización particular, el animal no humano es un mamífero, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en mono, cerdo, rata y ratón.

20 Una vez que los ratones transgénicos han sido generados pueden ser criados y mantenidos utilizando métodos bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, los ratones pueden ser alojados en una instalación de ambiente controlado mantenida en un ciclo de 10 horas de oscuridad y de 14 horas de luz, o con otro ciclo de luz apropiada. Los ratones pueden aparearse cuando están sexualmente maduros (de 6 a
25 8 semanas de edad). En ciertas realizaciones, los fundadores transgénicos se aparean con un animal no modificado (es decir, un animal que no tiene células que contienen el transgén), por ejemplo, a ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories).

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece.

35 Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la

técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de los pasos del método descritos la presente sin apartarse del alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en este documento, mientras que los mismos o similares resultados se logran.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Generación de los ratones con sobre-expresión de GluK4 en el cerebro anterior. a, esquema que muestra la disposición del transgén GRIK4. b, respuestas electrofisiológicas inducidas por glutamato (1 mM) y ATPA (0.1 mM) en células HEK293 que expresan el constructo más subunidades GluK2. La respuesta a ATPA revela la formación de receptores GluK2/K4 heteroméricos funcionales. Las barras de calibración verticales son 100 pA (respuesta superior) y 20 pA (parte inferior). La barra horizontal es de 200 ms. c, hibridación *in situ* en ratones normales (GluK4^{+/+}) y ratones que sobreexpresan GluK4. d, la detección del GluK4 transcrito a partir del transgén por el anticuerpo anti-myc. e, procesamiento glucolítico normal de la proteína GluK4 exógena en ratones GluK4^{over}.

Figura 2A-2G. Los ratones GluK4^{over} muestran mayor expresión de la proteína GluK4 y presentan déficits en la interacción social. Figura 2a, cuantificación mediante Western blot (parte superior) de la proteína endógena (GluK4) y la proteína transgénica derivada (myc-GluK4) en el hipocampo (HPC) y el neocórtex (Ncx) tanto de ratones transgénicos (Tg) como de sus compañeros de camada que no llevan el transgén (WT). Los histogramas de la parte inferior representan la media \pm SEM de mediciones de 4 (Tg) y 3 (WT) muestras independientes realizadas por duplicado. Figura 2b, los niveles de expresión de otras subunidades del receptor de kainato (GluK5 y GluK2/3) y subunidades del receptor de AMPA (GluA2/3) en los ratones transgénicos GluK4^{over} y sus compañeros de camada de tipo salvaje en la corteza cerebral y el hipocampo. Los histogramas de la parte inferior reflejan la media \pm SEM de mediciones en 4 (Tg) y 3 (WT) animales realizadas por duplicado (*p < 0,05, prueba t de Student). Figuras 2c, 2d y 2e, se muestra en la parte superior la representación esquemática del dispositivo de tres cámaras con ejemplos representativos superpuestos de los trayectos realizados por ratones GluK4^{over} y ratones normales en la prueba de interacción social. Los histogramas de la parte inferior son

cuantificaciones de datos a partir de 11 ratones de cada genotipo. Los ratones GluK4^{over} discriminan bien entre un objeto inanimado y un congénere (Figura 2c), pero al contrario de lo que ocurre en los ratones normales (Figura 2d), los ratones GluK4^{over} pasaron un tiempo similar en las zonas ocupadas por el ratón nuevo y el familiar, respectivamente, lo que indica alteración de la interacción social (Figura 2e). Los ratones GluK4^{over} permanecieron más tiempo en la cámara ocupada por animales familiares, pero lejos de ellos (círculo en la figura 2e) (n=11 ratones de cada genotipo, *** p<0,001, prueba t de Student). Figura 2f, los ratones GluK4^{over} mostraron anhedonia: su preferencia por el agua con sacarosa fue menor que la de los ratones normales (n=22, p<0,001, prueba t de Student). Figura 2g, en la prueba de natación forzada, los ratones GluK4^{over} permanecieron inmóviles durante más tiempo que los ratones normales, lo que es compatible con un estado depresivo. Este comportamiento se invirtió en los ratones deficientes para GluK4 (n=9 ratones de cada genotipo, p<0,001, prueba t de Student).

15

Figura 3. Prueba de la interacción social en ratones GluK4^{over}. a, trayectorias representativas de un ratón que sobreexpresa GluK4 en el aparato de tres cámaras. El animal explora ambas cámaras, incluyendo donde se encuentra un ratón nuevo (rojo) y un ratón familiar (gris). La exploración termina con el ratón descansando en la cámara ocupada por el ratón familiar pero lejos de él (flecha). b, cuantificación (n=11 ratones de cada genotipo) del tiempo pasado por los ratones normales y los que sobreexpresan GluK4 en cada cámara excluyendo la interacción directa con los congéneres. * p <0,05; **p <0,01, prueba t de Student.

20

25

Figura 4. Los ratones que sobreexpresan GluK4 muestran indicios graves de ansiedad. a-c, trayectos representativos (arriba) de los ratones normales y GluK4^{over} durante la exploración de un laberinto en cruz elevado (a) (líneas más gruesas denotan los brazos cerrados), una arena abierta (b) y la caja de luz-oscuridad (c). El área sombreada en b denota el área no considerada como centro del escenario, que aparece como un cuadro claro. Los histogramas de la parte inferior son cuantificaciones (media±SEM) de varios parámetros de cada prueba de comportamiento a partir de 9 (a, b) y 11 animales (c) de cada fenotipo. p <0,001, test t de Student.

30

35

Figura 5. a, los ratones que sobreexpresan GluK4 pasaron más tiempo inactivos que sus compañeros de camada normales (n = 9 ratones de cada genotipo, p <0,001,

prueba t de Student). b, los ratones transgénicos y sus hermanos de camada control realizan igualmente bien la prueba del rotarod a largo de los días, y no muestran ninguna indicación de impedimento locomotor. Los puntos son $\text{media} \pm \text{SEM}$ de 10 experimentos en cada caso.

5

Figura 6. La transferencia sináptica a través del circuito trisináptico del hipocampo está alterada en ratones $\text{GluK4}^{\text{over}}$. El recuadro en la mitad de la figura muestra la disposición de los electrodos de registro y estimulación en el hipocampo *in vivo* de animales normales y $\text{GluK4}^{\text{over}}$. a, curva de estímulo-respuesta para fEPSP registrado por los electrodos en el estrato molecular del giro dentado (DG) en ratones normales (gris) y que sobreexpresan GluK4 (negro). b, las curvas de estímulo-respuesta para la espiga poblacional registrada justo por debajo de la capa de células granulares del DG. Se aplica el mismo código de color. c, Curva de estímulo-respuesta para el fEPSP evocado trisinápticamente en el estrato radiado de CA1, donde termina la vía de las colaterales de Schaffer. Las curvas son significativamente diferentes (ANOVA de dos vías, $p=0,002$). Los insertos en a-c son ejemplos ilustrativos de espuestas promediadas ($n=9$ para $\text{GluK4}^{+/+}$ y 8 para $\text{GluK4}^{\text{over}}$). d, La curva de entrada-salida se construyó teniendo en cuenta las amplitudes de la espiga poblacional registrada en el DG como la entrada y la amplitud del EPSP trisináptico de CA1 como la salida del circuito. Las pendientes diferentes en la recta de regresión denotan un cambio en la ganancia del circuito.

10

15

20

25

30

35

Figura 7. La transmisión sináptica de las fibras musgosas a las células piramidales de CA3 muestra un aumento de ganancia en ratones que sobreexpresan GluK4 . A, esquema del hipocampo con los electrodos de registro (Rec) y estimulación (STIM) (MF, fibras musgosas; DG, giro dentado). B-c, EPSCs espontáneas mediadas por KAR en las células piramidales de CA3 registradas a -60 mV de potencial de membrana alineadas y superpuestas (líneas grises). El promedio resultante de todas las respuestas se presenta en línea gruesa. Los valores medios de la amplitud (b, derecha) y tiempos de deactivación (c) de estas respuestas se muestran para cada genotipo ($n=28$ y 29 neuronas a partir de 3 ratones $\text{GluK4}^{\text{over}}$ y $\text{GluK4}^{+/+}$, respectivamente, $p < 0,001$, prueba t de Student). d, mEPSCs mediadas por el receptor de AMPA ($V_m = -60$ mV) en cada genotipo (arriba) y cuantificación de su frecuencia y amplitud (parte inferior) a partir de 22 neuronas (2 ratones) y 20 neuronas (2 ratones) de ratones $\text{GluK4}^{\text{over}}$ y $\text{GluK4}^{+/+}$, respectivamente; ($p < 0,001$, prueba t de Student). e, EPSCs producidas por fibras musgosas en neuronas de la CA3 (arriba) y

su cuantificación (abajo) para cada genotipo (10 neuronas de 5 ratones GluK4^{over} y 13 neuronas a partir de 5 ratones GluK4^{+/+}, $p < 0,001$, prueba t de Student). f, facilitación por pares de pulsos de las respuestas sinápticas de CA3 a varios intervalos para cada genotipo. Los puntos son la media \pm SEM de 22 células (12 ratones GluK4^{over}) y 32 células (11 ratones GluK4^{+/+}) (ANOVA de dos vías y post-hoc de test Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Figura 8. Efecto de la fluoxetina y tianeptina en el modelo de depresión GluK4^{over}. La fluoxetina (un inhibidor de la recaptación de serotonina, ISRS) (10 mg/kg) y tianeptina (8 mg/kg) se inyectaron i.p. durante 30 días y después los animales se sometieron a pruebas de natación forzada. La acción de estos tratamientos sobre la depresión se evaluó anotando el tiempo de inmovilidad. Como puede verse, la tianeptina pero no la fluoxetina, suprime los signos de depresión en ratones GluK4^{over}. Número de animales evaluados: 7 WT y 6 GluK4^{over} de solución salina; 5 WT y 8 GluK4^{over} para la fluoxetina; 9 WT y 10 GluK4^{over} para tianeptina. Los valores son la media \pm SEM. Prueba de ANOVA ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 9. Efecto de la fluoxetina y tianeptina en el modelo de ASD GluK4^{over}. La fluoxetina (10 mg/kg) y tianeptina (8 mg/kg) se inyectaron i.p. a los ratones durante 30 días tras lo cual se les presentó una solución de 3% de sacarosa en agua potable. La acción de estos tratamientos sobre la anhedonia fue evaluada al anotar el consumo de sacarosa en ratones GluK4^{over} y sus hermanos (GluK4^{+/+}) como controles. Como se puede ver, la tianeptina pero no la fluoxetina normaliza la anhedonia en ratones GluK4^{over}. Número de animales evaluados: 7 WT y 6 GluK4^{over} de solución salina; 5 WT y 8 GluK4^{over} para la fluoxetina; 9 WT y 10 GluK4^{over} para la tianeptina. Los valores son la media \pm SEM. Prueba de ANOVA * $p < 0,05$.

Figura 10. Efecto de la tianeptina en el modelo de ansiedad GluK4^{over}. La tianeptina (8 mg/kg) se inyectó por vía intraperitoneal a ratones durante 30 días y después se sometieron al test del laberinto elevado (A) o al test de campo abierto (B). La acción de este tratamiento sobre la ansiedad se evaluó al anotar las entradas en los brazos abiertos (A) o el tiempo pasado en el centro de la arena (B). Como puede verse la tianeptina no tiene acción sobre estos dos parámetros, pero normaliza la actividad locomotora en ratones GluK4^{over}. Número de animales evaluados: 7 WT y 6 GluK4^{over} de solución salina; 9 WT y 10 GluK4^{over} para la tianeptina. Los valores son la media \pm SEM. Prueba de ANOVA ** $p < 0,01$.

Figura 11. Efecto de la fluoxetina en el modelo de ansiedad GluK4^{over}. La fluoxetina (10 mg/kg) se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal durante 30 días y después fueron sometidos a la prueba de campo abierto. La acción del tratamiento sobre la ansiedad se evaluó al anotar el tiempo pasado por los ratones en el centro del campo. El inhibidor de la recaptación de serotonina, fluoxetina, no tiene acción sobre el grado de ansiedad en ratones GluK4^{over}. Mas por el contrario, este antidepresivo induce ansiedad en ratones normales y aumenta los signos de ansiedad en ratones GluK4^{over}. La fluoxetina tampoco mejoró la locomoción. Número de animales evaluados: 7 WT y 6 GluK4^{over} de solución salina; 5 WT y 8 GluK4^{over} para la fluoxetina. Los valores son la media±SEM. Prueba de ANOVA * p <0,05, ** p <0,01.

EJEMPLOS**Ejemplo 1****Modelo animal no humano para los trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión**

5

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ratones que sobreexpresan GluK4 (ratones GluK4^{over}) utilizados en este estudio fueron generados mediante la introducción de 5 etiquetas Myc en pauta con el codón de inicio GRIK4 bajo el control del promotor de CaMKII. La expresión génica se evaluó mediante hibridación *in situ*, los niveles de proteína por inmunocitoquímica y en Western blot con anticuerpos de ratón anti-myc y de conejo anti-GluK4. Se utilizaron muestras de tejido del hipocampo y neocórtex de los ratones adultos, y con los Western blot se emplearon adicionalmente anticuerpos contra GluK2/3, GluK5 y GluA2/3. Los ratones GluK4^{over} fueron evaluados en una serie de pruebas de comportamiento, incluyendo paradigmas de interacción social, pruebas de natación forzada para la depresión, el laberinto elevado en cruz, escenario de campo abierto y la caja de luz oscura para la ansiedad. La actividad de la red neuronal se evaluó en el hipocampo *in vivo* utilizando un tipo de matriz de electrodos Michigan para registrar electrofisiológicamente los potenciales de campo de los subcampos en las áreas CA1 y giro dentado. Los shocks eléctricos aplicados a la vía perforante activan el circuito hipocampo trisináptico y sirven para evaluar las curvas de entrada-salida. La transmisión sináptica de las fibras musgosas al CA3 se estudió con más detalle por grabaciones de *patch clamp* en rodajas de hipocampo (300 µm) a partir de P19-21 ratones. La transmisión sináptica mediada por receptores KAR y AMPA se evaluó en ratones transgénicos y sus compañeros control de camada en un ensayo ciego. Todo el mantenimiento de los animales y el manejo de acuerdo con la normativa española y de la UE (Directiva 2010/63/UE).

30

Animales

Los procedimientos experimentales que involucran el uso de ratones vivos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa española y de la UE (2010/63/UE), y fueron aprobados por el Comité de Bioética interno del Instituto de Neurociencias y del CSIC. Los animales se alojaron en jaulas ventiladas en un ambiente SPF de temperatura controlada, (23° C), a una humedad entre 40% y 60%, y en un ciclo de 12 horas de

35

luz/oscuridad. Los ratones tenían acceso *ad libitum* a la comida y el agua y las jaulas se cambiaron semanalmente.

Generación de líneas de ratón

5 Una etiqueta que contiene 5 epítomos Myc fue añadida al ADNc de rata *grik4*, justo después del péptido señal (primeros 20 aminoácidos). La funcionalidad del plásmido pcDNA3 myc *grik4* se ensayó a través de grabaciones electrofisiológicas cuando se expresa en células HEK293. El constructo *Myc-grik4* para generar los ratones transgénicos se clonó en dos etapas consecutivas. En primer lugar, *Myc-grik4* se
10 clonó como un fragmento *Eco RV-Sma I* en el plásmido pNN265 que contiene una secuencia intrónica necesaria para el correcto funcionamiento del promotor de CaMKII (Figura 1). Posteriormente, un fragmento *Not I* que contiene *Myc-grik4* y la secuencia intrónica se introdujo en el plásmido PMM403 que tiene el promotor CaMKII insertado en pBluescript (Mayford, M., et al.1996. *Transgene Science* 274, 1678-1683). La
15 construcción se cortó con la enzima de restricción *Sfi I* para eliminar la estructura de pBluescript y se inyectó en el pronúcleo de huevos fertilizados (realizado en la Unitat Animals Transgènics -UAT-CBATEG-, Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica, Universitat Autònoma de Barcelona).

20 De los nueve fundadores obtenidos, uno se descartó debido a la integración en el cromosoma Y. Se analizaron los niveles de expresión de *Myc-grik4* en la generación F1 por hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y en Western blots. Dos líneas diferentes con similares niveles de expresión fueron elegidas para estudios posteriores.

25

Western blots

Lisados de proteínas de hipocampo y corticales se analizaron en Western blots que se testaron con los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-alfa-tubulina (1:1000, Abcam), ratón anti-Myc (1:500, Santa Cruz), de conejo anti-GluR6/7 y de conejo anti-
30 KA2 (1:1000, Millipore), conejo anti-GluR2/3 (1:1000, Novus Biological) y de conejo anti-KA1 (1:1000: un generoso regalo del doctor Melanie Darstein) (Darstein, M., et al. 2003. *J. Neurosci.* 23, 8013–8019). La unión de anticuerpos fue detectada mediante un analizador de imágenes luminiscentes (LAS-1000plus; Fuji) y se cuantificó con Quantity One 1D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories). Para cuantificaciones,
35 todas las densidades se normalizaron a la señal de la tubulina respectiva.

Inmunohistoquímica

Los ratones adultos fueron perfundidos transcárdialmente con un 4% de paraformaldehído, y su cerebro fue extraído y fijado posteriormente toda la noche en paraformaldehído al 4%. Las secciones (50 µm) se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos de pollo anti-Myc (1:1000 Abcam) en solución de bloqueo (PBS 0,1%, Triton X-100 al 2%, BSA al 4% y NGS). El anticuerpo se visualizó usando el kit de ABC Elite (Vector Laboratories) y diamonobenzidine reducida por peroxidasa (Sigma).

Deglicosilación

EndoH/PNGaseF se testó igual que se ha descrito previamente (Catches, J. S., et al. 2012. *Behavioural Brain Research* 228, 406–414), con lo que 500 unidades de EndoH (P0702; New England Biolabs) se usaron para eliminar los oligosacáridos con alto contenido en manosa; y una cantidad igual de PNGaseF (P0704 New England Biolabs) se empleó para eliminar todos los oligosacáridos N-ligados. Después de una digestión 1 hora, se analizaron los lisados en Western blot con anticuerpos de ratón anti-Myc (1:500) y de conejo anti-KA1 (1:1000).

Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* se realizó con sondas de oligonucleótidos específicos marcadas con ³⁵S como se describió previamente (Wisden W. and Morris B. J. 2002. *Int Rev Neurobiol.* 47, 3-59). Como control de especificidad, dos oligonucleótidos independientes para el gen *grik4* se hibridaron en paralelo y produjeron idénticos resultados. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas fueron:

Grik4 a: 5'-CTTG TAGTTGAACCGTAGGATCTCAGCCAACTCCTTGAGCATGTC-3' [SEQ ID NO: 10]
 Grik4 b: 5'-TAGCCCGGTCTGCGTCCCATATGAACTCTGTAAAGAATACTA-3' [SEQ ID NO: 11]
 Myc: 5'-CTCCATTTCAATTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCCAT-3' [SEQ ID NO: 12]

Pruebas de comportamiento

Las pruebas de comportamiento se realizaron en ratones de 8-12 semanas de edad, utilizando dos cohortes diferentes de 20 ratones cada una.

Campo abierto

La prueba de campo abierto se llevó a cabo en un escenario de 50 cm x 50 cm de largo durante 30 minutos, anotando el comportamiento con un sistema de seguimiento de vídeo (Panlab, España). Las diferencias en la distancia recorrida, el tiempo de descanso, y el tiempo en el centro y la periferia del escenario, se calculó para ratones GluK4^{+/+} y GluK4^{over} en relación con el tiempo total.

Laberinto elevado en cruz

Un laberinto de metal elevado 50 centímetros por encima del suelo que contenía dos brazos oscuros y cerrados, y los dos brazos abiertos y con luz, se utilizó para examinar los comportamientos similares a la ansiedad. Los brazos eran 50x10 centímetros de tamaño con una zona central 10x10 centímetros, y las paredes de los brazos cerrados eran 30 centímetros de alto. Los ratones individuales se colocaron en el centro del laberinto, fueron seguidos durante 10 minutos con una cámara de vídeo y luego volvieron a su jaula de alojamiento. El laberinto elevado fue limpiado entre los ensayos con una solución de alcohol al 70%. El tiempo y la frecuencia de las visitas a las diferentes zonas del laberinto fue evaluado utilizando el Smart Video Tracking System (Panlab, Spain).

Prueba de natación forzada

Cilindros de plexiglás transparente, 50 centímetros de alto y con un diámetro de 25 centímetros, se llenaron hasta aproximadamente a 25 centímetros con agua del grifo a 22-24°C, de tal modo que los ratones no fueron capaces de tocar el suelo o escapar. Los ratones individuales se colocan en el agua para una sesión de 6 minutos y se grabaron en vídeo para su posterior análisis. Al final de cada sesión, los ratones se secaron con una toalla de papel y regresaron a su jaula, y el agua se sustituyó para el siguiente ensayo. El tiempo de inmovilidad, definido como una falta de natación activa, fue anotado.

Prueba de luz/oscuridad

El aparato de prueba consistía en dos cajas rectangulares de plexiglás (20x20x20 centímetros) conectadas por un pequeño pasillo (6 centímetros). Uno era abierto e iluminado, mientras que el otro compartimento estaba oscuro. Cada ratón se colocó en el compartimento oscuro y se mantiene en la arena durante 10 minutos. El tiempo en el que dejó el compartimento oscuro por primera vez y el tiempo pasado en el compartimento iluminado fue medido por la grabación de vídeo y el análisis utilizando Smart software (Panlab, Spain).

Prueba de ingesta de sacarosa

La anhedonia fue evaluada mediante el control de la ingesta de sacarosa. Durante una semana, a los animales se les proporcionó dos botellas de agua potable, una con agua del grifo y otra con una solución al 2% de sacarosa. Después de esta
 5 aclimatación, los ratones podían elegir beber de cualquiera de las soluciones, de sacarosa o de agua del grifo durante un período de 4 días. Se midió la ingesta de agua y solución de sacarosa diariamente, y se cambió la posición de las dos botellas diariamente para reducir el sesgo lateral. La preferencia por la sacarosa se calculó como un porcentaje del volumen de la ingesta de sacarosa sobre el volumen total de
 10 ingesta de líquidos y promedio durante los 4 días de pruebas.

RotaRod

Utilizamos el RotaRod de Ugo Basile (Italia) para la prueba de la coordinación motora. Un día antes de la prueba, los animales fueron entrenados en el set RotaRod a 16
 15 rpm hasta que pudieran permanecer en él durante 30 s. Para las pruebas, el RotaRod se estableció para que acelerara de 4 rpm a 40 rpm en el transcurso de 5 minutos, y la latencia para caer de la varilla fue registrada. La prueba se realizó en 4 días consecutivos, tres veces al día.

Prueba de interacción social de las tres cámaras

Esta prueba se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Yang M., et al. 2011. *Curr. Protoc. Neurosci.* 56, 8.26.1-8.26.16; Smith SE1, et al. 2011. *Sci Transl Med* 3, 103ra97). Brevemente, el aparato social consiste en una caja rectangular de tres
 25 cámaras, cada cámara de medición 20 centímetros de largo x 40,5 centímetros de ancho x 22 centímetros de alto. Las paredes divisorias eran de plexiglás transparentes, con pequeñas aberturas (10x5 centímetros) que permiten el acceso a cada cámara. La prueba consistió en cuatro fases: fase I, un periodo de habituación de 5 minutos, donde el ratón se movía libremente en la cámara central; fase II consistió en habituar a los ratones a las tres cámaras durante 5 minutos con dos
 30 cilindros de cuadrícula redondas vacías situados en la esquina de cada una de las salas laterales; En la fase III la sociabilidad ratón se determinó durante 5 minutos midiendo el tiempo dedicado por el ratón con libertad de movimientos en la proximidad y en la cámara de la carcasa de la caja de rejilla que contenía un primer ratón extraño; y, finalmente, la fase IV fue la prueba de preferencia por la novedad social, cuando un
 35 segundo ratón novel se colocó en el interior del cilindro de rejilla previamente vacío mientras que el primer ratón novedoso se mantuvo dentro de su cilindro de rejilla. La

preferencia por la novedad social se definió como el tiempo en la cámara con el ratón nuevo y el tiempo de inhalación del ratón novel en comparación con el ratón familiar. Las trayectorias fueron grabadas y analizadas con Smart software.

5 **Registros electrofisiológicos**

Los cortes de hipocampo se prepararon a partir de ratones de 14 a 16 días de edad, como se describe en detalle en otros trabajos (Christiansen et al., 2004, *J. Neurosci.* 24, 8986–8993). En pocas palabras, todo el cerebro que contiene ambos hipocampos se colocó en el escenario de una máquina de cortar vibratome y se cortó para obtener

10 cortes de cerebro sagital de 300 μm de grosor, y que se mantuvieron oxigenados continuamente durante al menos 1 hora antes de su uso. Los registros electrofisiológicos se realizaron a partir de neuronas identificadas visualmente por microscopía IR-DIC utilizando un objetivo de inmersión en agua 40x. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-25°C). Los cortes fueron

15 perfundidos continuamente con una solución que consiste en (en mM) 124 NaCl, 2,69 KCl, 1,25 KH_2PO_4 , 4 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 y 10 glucosa (pH 7,3; 300 mOsm), suplementado con fármacos (LY303070, APV, picrotoxina) según sea necesario. Los EPSCs fueron provocados por impulsos eléctricos aplicados al giro dentado con un electrodo bipolar. Grabaciones de células completas selladas herméticamente ($>1\text{G}\Omega$)

20 se obtuvieron a partir del cuerpo celular de las neuronas piramidales CA3. Los parche de electrodos fueron fabricados de cristal de borosilicato y con una resistencia de 5-10 $\text{M}\Omega$ cuando se llena con (en mM): 122 CsCl, 8 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 10 TEA (pH 7,3, 287 mOsm), suplementado con 5 mM de QX-314 (Alomone Laboratories, Israel). El potencial de membrana se fijó utilizando un amplificador Axopatch 200A (Axon

25 Instruments). La resistencia de acceso (8-30 $\text{M}\Omega$) se controló regularmente durante las grabaciones y las células fueron rechazadas si había cambiado más de un 15% durante el experimento. Los datos fueron filtrados a 2 kHz, digitalizados y almacenados en un ordenador con el software pClamp.

30 En las células HEK293 transfectadas, los experimentos electrofisiológicos se llevaron a cabo 1 día después de la transfección con el plásmido. Las células fueron perfundidas rápidamente usando un conjunto lineal de tubos de vidrio colocado a 200-300 micras desde el cuerpo celular accionado por un dispositivo motorizado bajo el control de un ordenador personal.

35

RESULTADOS

El papel desempeñado por los receptores de kainato (KARs) en la fisiología del cerebro está peor entendida que la de otros receptores de glutamato, sin embargo, ahora está claro que juegan un papel importante en la sinapsis y en la maduración de los circuitos neuronales durante el desarrollo. Para evaluar el posible papel desempeñado por la variación en el número de copias (CNVs) de genes que codifican para la subunidad GluK4 en ASDs, se evaluaron las consecuencias fisiológicas y de comportamiento de sobre-expresión de *grik4* en el prosencéfalo de ratón bajo el control del promotor de CaMKII (Figura 1). Dos de 9 líneas de ratones en los que los diferentes niveles de expresión *grik4* fue evidente (líneas GluK4^{over}) se seleccionaron. En los Western blot la proteína codificada por *grik4*, GluK4, se-sobreexpresaba en un 40% en el hipocampo y ligeramente más del 100% en el neocórtex. Otras subunidades KAR fueron inducidas, ya sea en la corteza, pero no en el hipocampo (GluK2) o fueron reprimidos en el hipocampo (Figura 2a, 2b), probablemente reflejando un proceso para compensar el exceso de GluK4.

El efecto de la sobre-expresión de GluK4 en la conducta se evaluó mediante una amplia batería de pruebas de comportamiento, lo que demuestra diferencias significativas entre los ratones GluK4^{over} y sus hermanos GluK4^{+/+}. Dado que el diagnóstico del autismo se basa en el déficit en el comportamiento social, las interacciones sociales se miraron primero. En la prueba de interacción social de tres cámaras (Nadler, J. J. *et al.* 2004. *Genes Brain Behav.* 3, 303–314), tanto los ratones GluK4^{over} como los de tipo salvaje interactuaron con más fuerza con un ratón que con un objeto, lo que indica un nivel correcto de la discriminación de los congéneres de los objetos inanimados (Figura 2c). Sin embargo, en contraste con los ratones normales, los GluK4^{over} interactuaron con los ratones igualmente nuevos y familiares cuando se enfrentan a un ratón nuevo (Figura 2c, 2d), lo que indica un déficit en sus interacciones sociales, típica de los ASDs. El seguimiento de las trayectorias de los ratones GluK4^{over} revelaron una tendencia a permanecer en la cámara ocupada por los ratones familiares, aunque lejos de ellos (Figura 2c). Además, el tiempo gastado por los GluK4^{over} en la cámara ocupada por cualquiera de los ratones, excluyendo el área en estrecha proximidad, además reveló que los animales transgénicos pasaron significativamente menos tiempo en la cámara ocupada por el nuevo ratón, tendiendo a permanecer en la cámara ocupada por el ratón familiar una vez la exploración se había completado (Figura 3).

En niños con ASDs se ha demostrado recientemente algún grado de anhedonia (Chevallier, C., et al 2012. *J Autism Dev Disord* **42**, 1504–1509), es decir, la ausencia de experimentar acontecimientos vitales normalmente placenteros como comer. Curiosamente, los ratones GluK4^{over} reflejan un grado significativo de anhedonia en comparación con ratones normales, como fue evaluado por la menor ingesta de sacarosa (Figura 2f). dado que la anhedonia es un síntoma clínico de la depresión sometimos ratones GluK4^{over} a la prueba de natación forzada. Los animales transgénicos demostraron un índice mayor de inmovilidad que los ratones normales en esta prueba (Figura 2g), lo que demuestra el comportamiento depresivo. Para comprobar la participación directa de la proteína GluK4, este estado depresivo se comparó con ratones deficientes para GluK4. Los ratones KO para *grik4* pasaron significativamente más tiempo nadando que los controles y los que sobre-expresan el transgen (Figura 2g), esto muestra una clara correlación entre la expresión de *grik4* y el estado anhedónico, y sugiere un papel directo para CNV de *grik4* en este trastorno de la conducta. También se ha señalado que los ratones GluK4^{over} podrían experimentar ansiedad, ya que evitan las áreas abiertas. La ansiedad se ensayó directamente en tres pruebas independientes empleadas habitualmente para evaluar tal comportamiento en los animales (Lalonde, R. & Strazielle, C. J.2008. *Neurosci. Methods* 171, 48–52): el laberinto elevado en cruz, el escenario de campo abierto y una caja de oscuridad/luz. En todas estas pruebas, los ratones GluK4^{over} muestran signos de ansiedad. Por ejemplo, pasaron significativamente menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado que sus hermanos (Figura 4a), estaban mucho menos dispuestos a explorar el centro de un campo abierto (Figura 4b) y pasaban más tiempo en la zona oscura que en la de luz en el test de luz/oscuridad (Figura 4c). En general, los ratones GluK4^{over} pasaron menos tiempo en movimiento que sus hermanos, recorriendo distancias más cortas en todas las pruebas. Sin embargo, esto no fue debido a cualquier deterioro motor, dado que los animales transgénicos y de tipo salvaje desempeñan igualmente bien en pruebas de rota-rod (Figura 5). Por el contrario, el aumento de los períodos sedentarios de ratones que sobreexpresan GluK4 podría reflejar una falta de motivación.

A la luz de lo anterior, se cuestionó si la sobreexpresión de la subunidad del receptor GluK4 podría influir en la transferencia de información normal en el cerebro. Los KARs neuronales han sido estudiados ampliamente en el campo CA3 del hipocampo, donde se han localizado en posiciones pre-y post-sinápticas. Además de la memoria, el

hipocampo ha sido asociado con los aspectos del procesamiento emocional, en particular, con la ansiedad. Por lo tanto, el flujo de información a través del circuito se evaluó en el circuito trisináptico del hipocampo, en la obtención de grabaciones *in vivo* usando un conjunto vertical de electrodos en animales anestesiados. La estimulación eléctrica suministrada a la vía perforante, la entrada en el circuito trisináptico, evocaron respuestas electrofisiológicas similares a través de los genotipos en el nivel de la primera sinapsis del giro dentado (DG). En consecuencia, no se encontraron diferencias en las curvas de entrada/salida medidas a nivel de las dendritas o el soma (Figura 6). Sin embargo, el potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP) evocado en el CA1 través de la activación trisináptica parece ser significativamente mayor en los ratones GluK4^{over} que en los ratones normales. En efecto, el trazado de la amplitud de pico de población del DG (PS) *versus* la pendiente de fEPSP en CA1 (es decir, la entrada y la salida al circuito trisináptico, respectivamente) reveló, además, un cambio en la ganancia de este circuito. Posteriormente, se evaluó la transmisión sináptica de las fibras musgosas a las neuronas piramidales CA3, el segundo relé sináptico en el circuito trisináptico, donde GluK4 está fuertemente expresado y parece jugar papeles fisiológicos críticos. Las corrientes mediadas por KAR excitatorios postsinápticos (EPSC_{KAR}) en ratones que sobreexpresaban GluK4 ha tenido una amplitud un 39% más grande que en los ratones normales y con tiempos de desactivación un 13% más rápidos (Figura 7a y 7b). Este resultado confirma que el exceso de proteína GluK4 expresada participa en los KARs funcionales. El análisis de las mEPSC mediadas por receptores AMPA en esta sinapsis, reveló una frecuencia mayor y la amplitud de mEPSCs en ratones GluK4^{over} (Figura 7d), y los EPSCs evocados también fueron consistentemente más grandes (Figura 7e). Por el contrario, la facilitación por pares de pulsos, una clase de plasticidad a corto plazo que es una característica de estas sinapsis, se vió afectado significativamente (Figura 7f). En conjunto, estos datos implican que la transferencia de información en estas sinapsis críticos se altera en ratones que sobreexpresan la subunidad GluK4 de los KARs.

30

El fenotipo de los ratones GluK4^{over} sugiere que esta proteína puede estar implicada en la patogénesis de trastornos del espectro autista, proporcionando un modelo para la investigación mecanicista de la enfermedad. Es importante destacar que, en el presente estudio se demuestra que un aumento moderado en los niveles de proteína (30-50%) en los animales que la sobreexpresan sin embargo se asocia a una penetrancia funcional profunda, alterando la transferencia de información y la

35

integración en una red robusta del hipocampo. El autismo se considera una enfermedad del desarrollo cerebral y hay fuerte evidencia que indica que los KARs influyen en el desarrollo de las redes neuronales. Por ejemplo, la actividad de la red inmadura parece influir en el desarrollo de la conectividad sináptica y los KARs juegan un papel crítico en la actividad de la red de estimulación en ambos del hipocampo en el desarrollo y adultos. Además, la actividad tónica de los KAR influye en la maduración y la elongación de neuritas. Por lo tanto, es concebible que la transmisión sináptica alterada a través de redes neuronales generalizadas surge como consecuencia del exceso de GluK4 en sinapsis glutamatérgicas particulares durante la formación y maduración de la red, lo que conduce a un cambio permanente en la ganancia sináptica.

Actualmente, los ASDs se cree que representan un continuo de la misma enfermedad con diferentes grados de severidad, y que hay superposición genética entre los ASDs y otros endofenotipos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos. Por ejemplo, los ASDs están asociados con indicaciones clínicas de la ansiedad. Por lo tanto, es bastante notable que los CNV de un solo gen puedan reproducir algunos endofenotipos vistos en el autismo, y de alguna manera imitar la situación en los seres humanos con un ASD. Tales alteraciones a la expresión de genes en ratones reflejan uno de los mecanismos moleculares que subyacen a los comportamientos anormales en los seres humanos. Por lo tanto, es posible utilizar este ratón para probar directamente tratamientos específicos de comportamientos relacionados con el autismo.

Dadas los claros fenotipos de depresión, ansiedad y anhedonia que estos ratones presentan, se ha querido comprobar si un antidepresivo bien conocido y/o ansiolíticos serían eficaces en estos fenotipos como una prueba de concepto en el uso de este modelo de ratón en la búsqueda de nuevos fármacos terapéuticos. Se decidió probar la fluoxetina y la tiapentina. La fluoxetina también se conoce por los nombres comerciales Prozac, Sarafem, Ladose y Fontex, entre otros, y es un antidepresivo de la clase del inhibidor de la recaptación de serotonina (SSRI) y se utiliza para el tratamiento del trastorno depresivo mayor (incluyendo la depresión pediátrica), trastorno obsesivo-compulsivo (en adultos y niños), la bulimia nerviosa y el trastorno de pánico. La tianeptina, que los nombres de marca son Stablon, Coaxil, Tatinol y Tianeurax, es un medicamento que se usa principalmente para el tratamiento de los principales trastornos depresivos; Químicamente es un antidepresivo tricíclico (TCA), pero tiene diferentes propiedades farmacológicas. Aunque puede servir como un

promotor de la recaptación de serotonina, la investigación más reciente indica que tianeptina produce sus efectos antidepresivos a través de la alteración indirecta de la actividad de los receptores de glutamato AMPA y NMDA (McEwen, BS et al., 2010, *Molecular Psychiatry* **15**: 237–49; Zhang H. Et al., 2013, *Molecular Psychiatry* **8**, 471-484).

Los ratones tipo salvaje y GluK4^{over} fueron inyectados con dosis equivalentes a las de su uso en seres humanos y el efecto sobre los síntomas de la anhedonia, ansiedad y depresión evaluados después de 30 días de tratamiento. La fluoxetina no tenía acción sobre la depresión en el modelo animal GluK4 de depresión según la evaluación de la prueba de natación forzada (Figura 8). Sin embargo, la tianeptina tuvo un fuerte efecto antidepresivo en estos ratones, restableciendo los valores de control de inmovilidad en este ensayo (Figura 8). Del mismo modo, la fluoxetina empeoró la anhedonia en ratones WT, un comportamiento fácilmente detectado en el autismo. Por otro lado, la tianeptina restauró los valores de control de la ingesta de sacarosa en ratones GluK4^{over}, lo que indica una fuerte acción inhibitoria de la anhedonia en este modelo de autismo (Figura 9). El efecto sobre la ansiedad se evaluó mediante la prueba de laberinto elevado en cruz y la prueba de campo abierto. La tianeptina no tenía efecto alguno en el tiempo pasado por los animales GluK4^{over} en el centro del campo abierto o en el número de entradas en el brazo abierto del laberinto elevado, lo que indica falta de efecto ansiolítico. Sin embargo, la tianeptina normalizó la actividad locomotora depresiva en ratones GluK4^{over} (Figura 10), lo que indica algún valor terapéutico en este modelo de ratón. En la prueba de campo abierto, la fluoxetina no sólo agravó la ansiedad en ratones GluK4^{over} ansiosos, sino que también produjo un poco de ansiedad en ratones normales (Figura 11). Todos estos datos indican la disparidad de acción de los antidepresivos conocidos y las drogas ansiolíticas dependiendo de la etiología de estas enfermedades, lo que indica que la búsqueda de fármacos nuevos y más adecuados debe continuar para tratar estos trastornos en una forma más afinada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un animal transgénico no humano que comprende integrada de manera estable en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal.
- 10 2. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 1, en donde la proteína GluK4 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% a la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 2, en el que la proteína GluK4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.
- 20 5. Un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína GluK4 es la proteína GluK4 de rata.
- 25 6. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 5, en el que la secuencia de nucleótidos se expresa en el hipocampo y/o en el neocórtex.
- 25 7. Un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 está unida operativamente a una secuencia reguladora de la expresión.
- 30 8. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 8, en el que la secuencia reguladora de la expresión es un promotor y/o un potenciador.
- 30 9. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 9, en el que el promotor es un promotor específico del Sistema Nervioso Central.
- 35 10. Un animal transgénico no humano según la reivindicación 10, en el que el promotor es el promotor CaMKII alfa o el promotor del gen *grik4*.

11. Un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende al menos 2 copias de la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4.

5

12. Un animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el animal es un mamífero, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en mono, cerdo, rata y ratón.

10

13. Un método para la detección, descubrimiento, identificación, evaluación y/o validación de un compuesto para el tratamiento de un trastorno del espectro autista, la ansiedad y/o la depresión, que comprende (a) administrar un compuesto candidato a un animal transgénico no humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y (b) determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre el comportamiento de dicho animal transgénico no humano o, alternativamente, la determinación del nivel de expresión de la proteína GluK4.

15

14. Uso de un animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cribado, descubrimiento, identificación, evaluación y/o validación de un compuesto o terapia para tratar trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

20

15. Uso del animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como un modelo animal para trastornos del espectro autista, ansiedad y/o depresión.

25

16. Un método de producción de un modelo animal no humano de autismo que comprende la expresión en el cerebro anterior del animal de una de secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que la secuencia de nucleótidos heteróloga se integra de forma estable en el genoma del animal no humano.

30

17. Método según la reivindicación 16, en donde la proteína comprende GluK4 secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 90% a la SEQ ID NO: 1.

35

18. Método según la reivindicación 17, en donde la proteína GluK4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

5 19. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GluK4 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde la proteína GluK4 es la proteína GluK4 de rata.

10

21. Método según la reivindicación 20, en el que la secuencia de nucleótidos se sobreexpresa en el hipocampo y/o en el neocórtex.

15 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 está unida operativamente a una secuencia reguladora de la expresión.

23. Método según la reivindicación 22, en el que la secuencia reguladora de la expresión es un promotor y/o un potenciador.

20

24. Método según la reivindicación 23, en el que el promotor es un promotor específico del Sistema Nervioso Central.

25 25. Método según la reivindicación 24, en el que el promotor es el promotor CaMKII alfa o el promotor del gen *grik4*.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, que comprende introducir al menos 2 copias de la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4 en el genoma del animal no humano.

30

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, en el que el animal es un mamífero, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en mono, cerdo, rata y ratón.

35

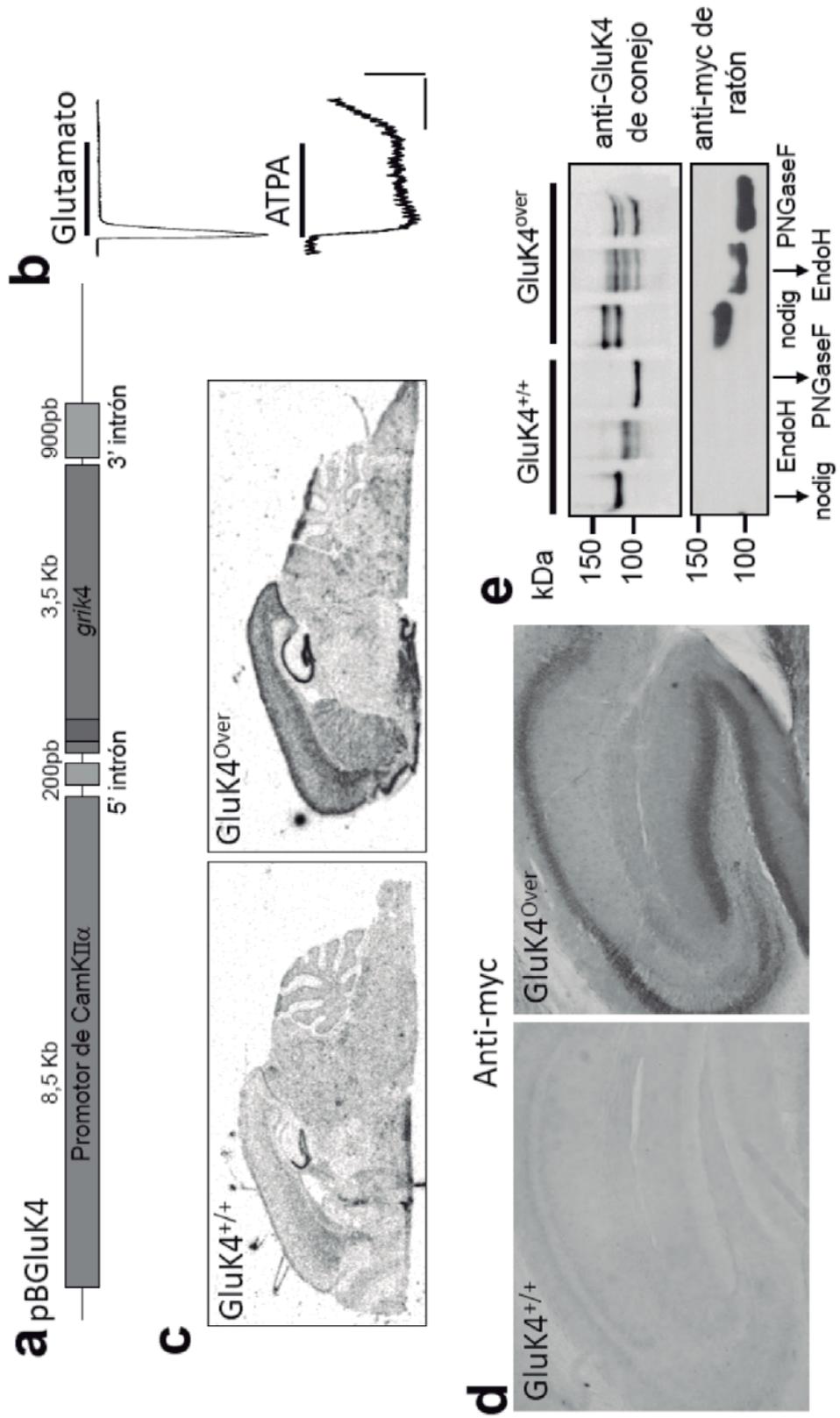


FIG. 1

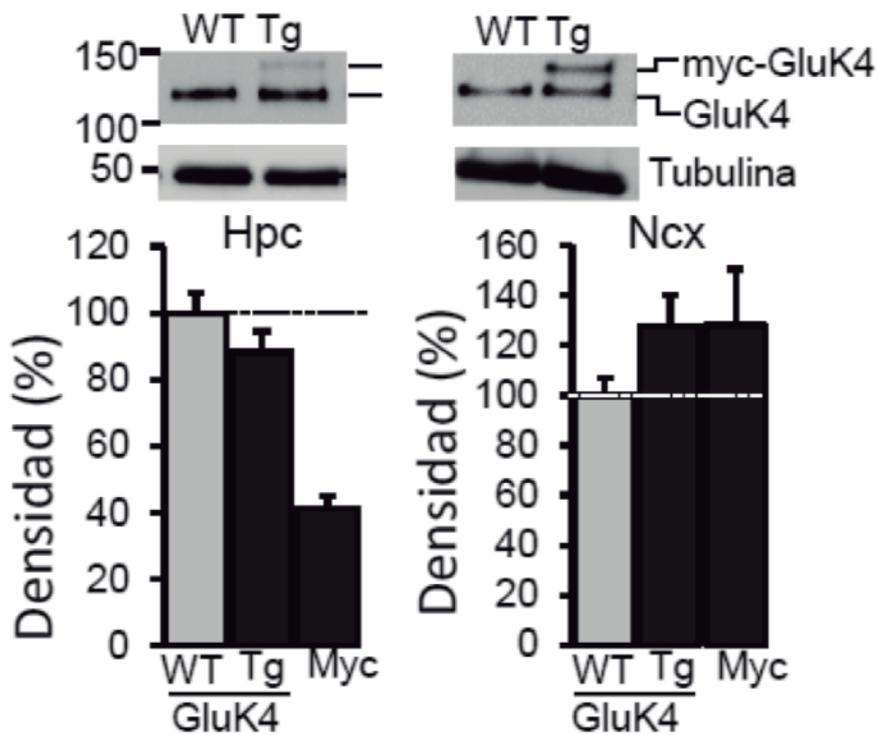


FIG. 2a

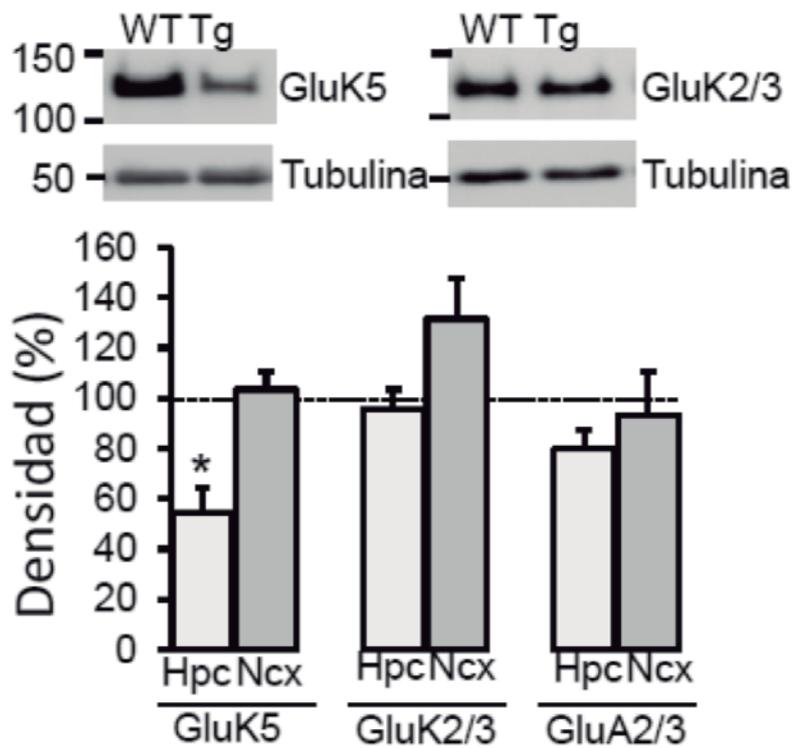


FIG. 2b

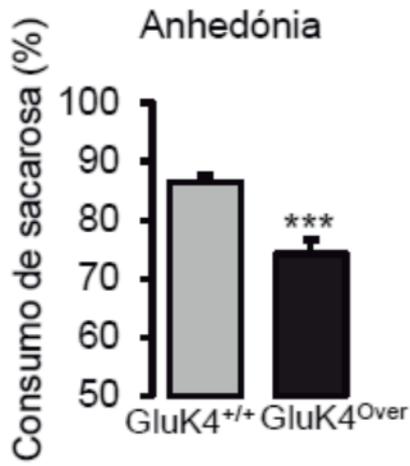
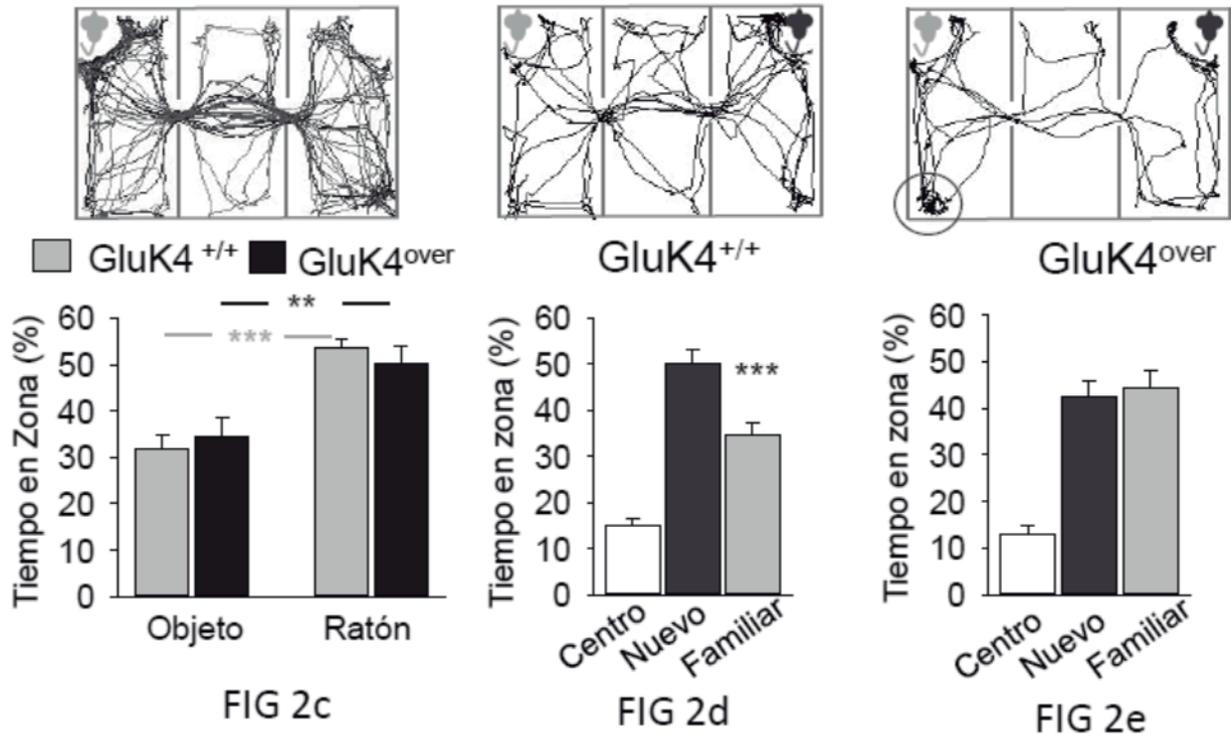


FIG 2f

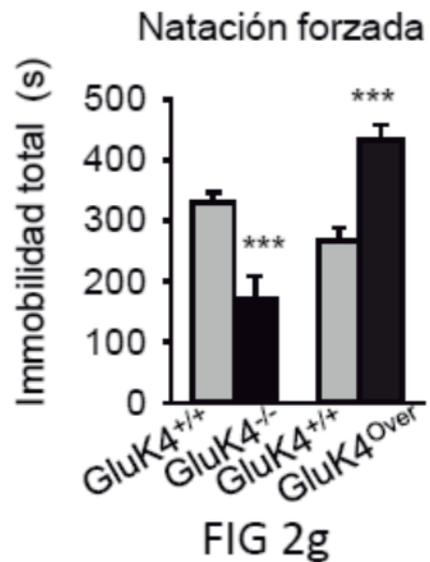


FIG 2g

a Zonas excluidas en la evaluación

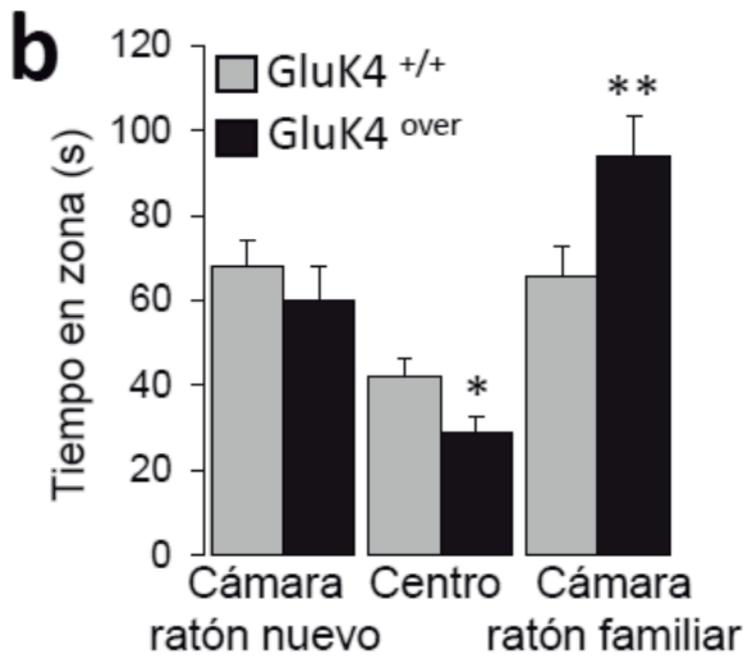
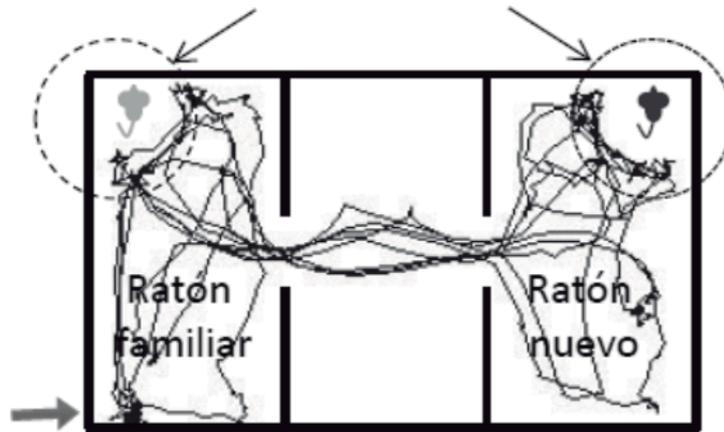


FIG. 3

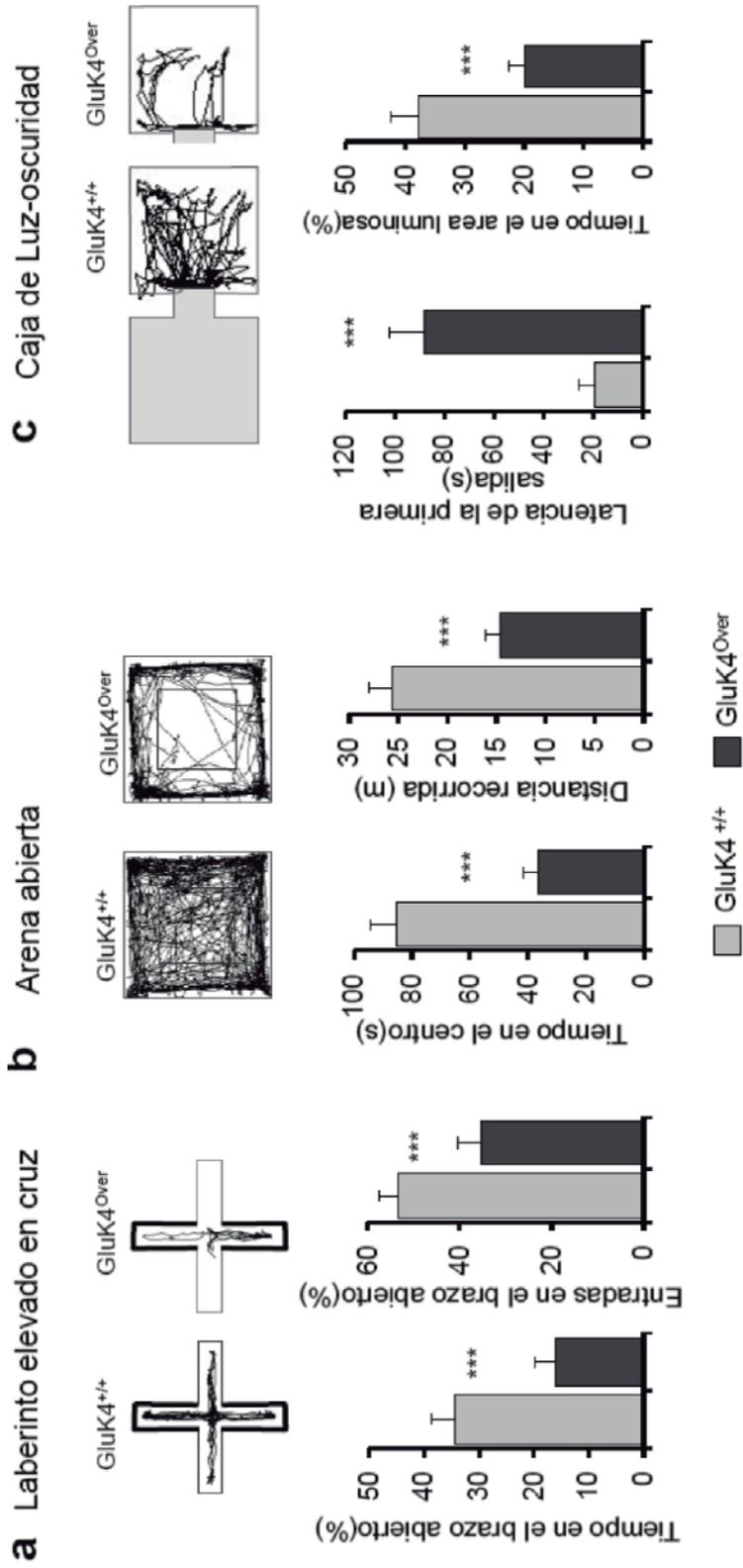


FIG. 4

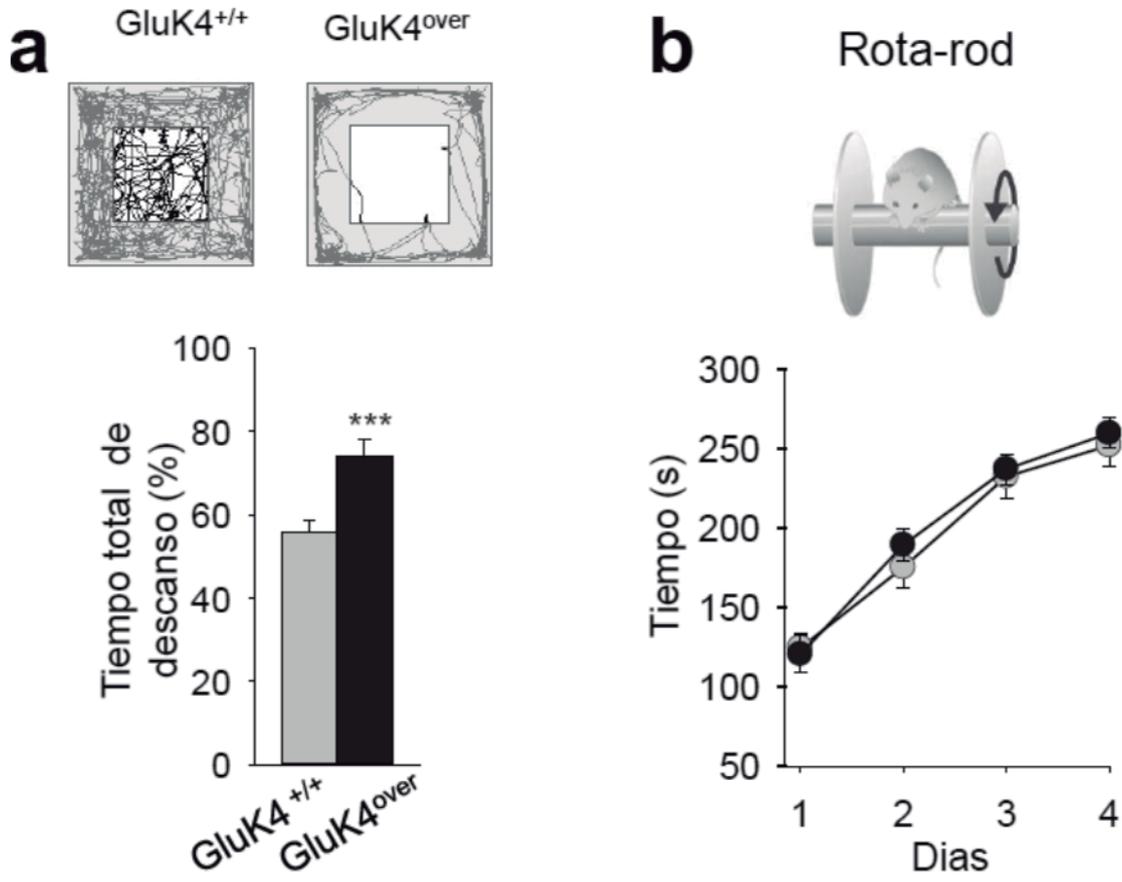


FIG. 5

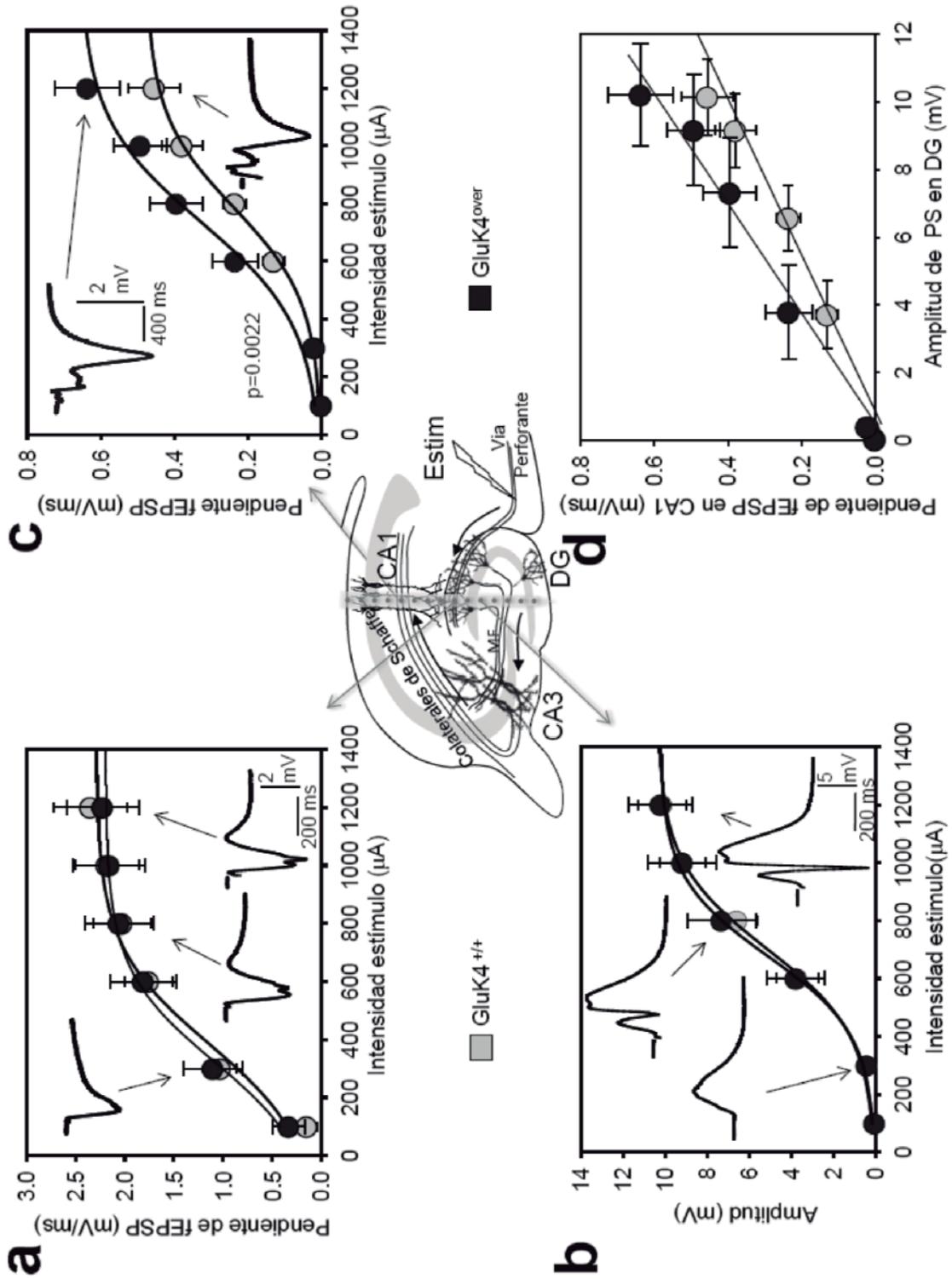


FIG. 6

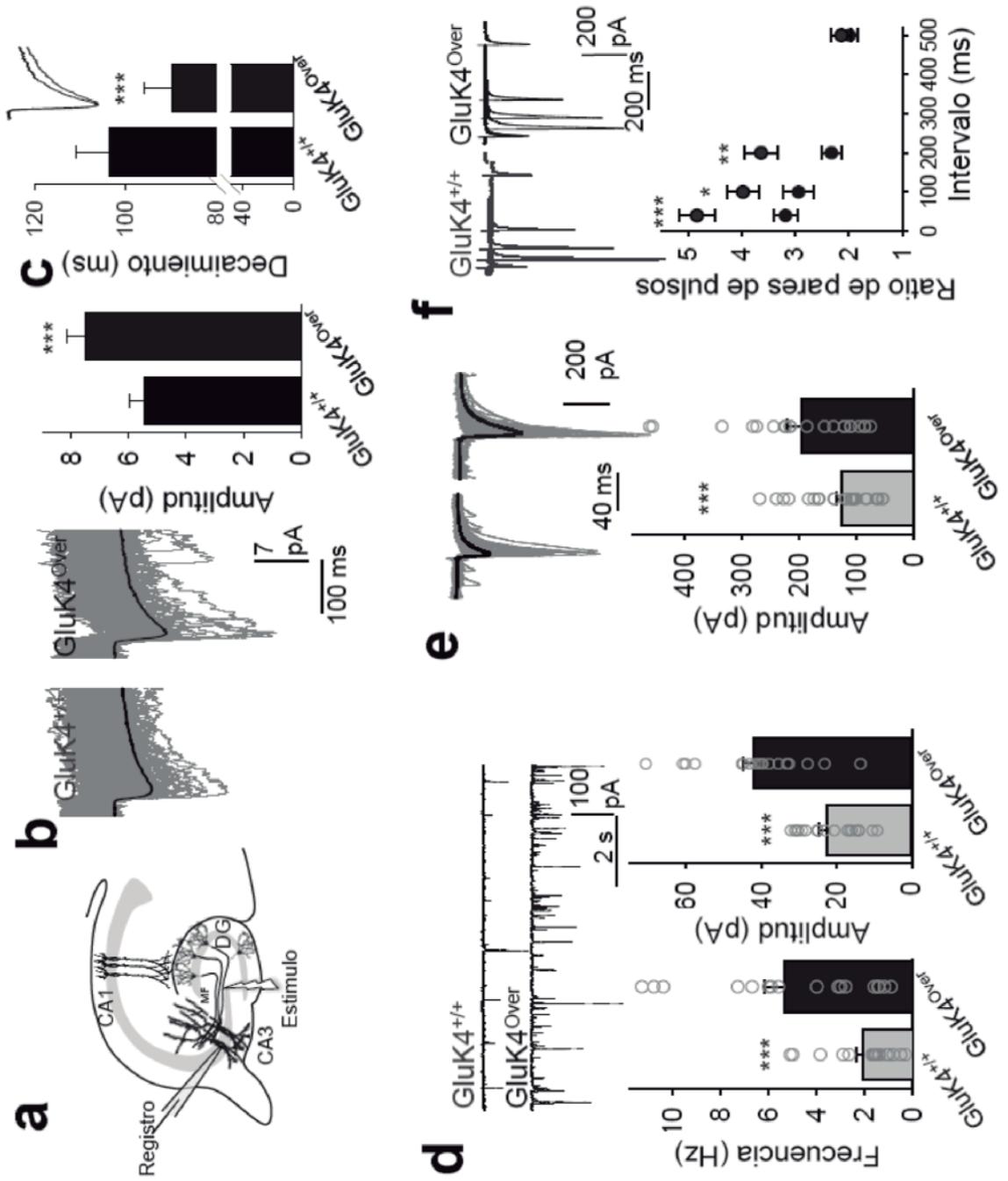


FIG.7

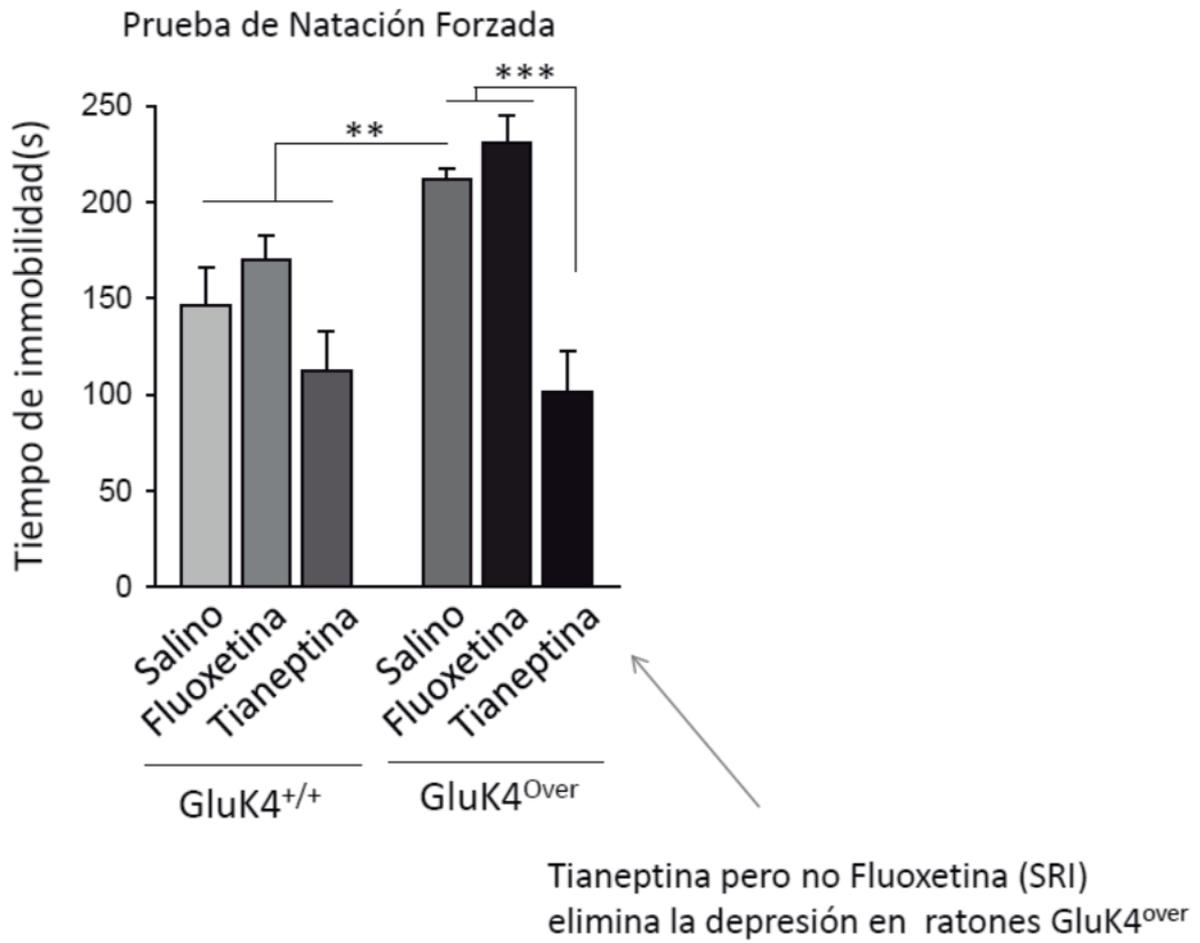


FIG. 8

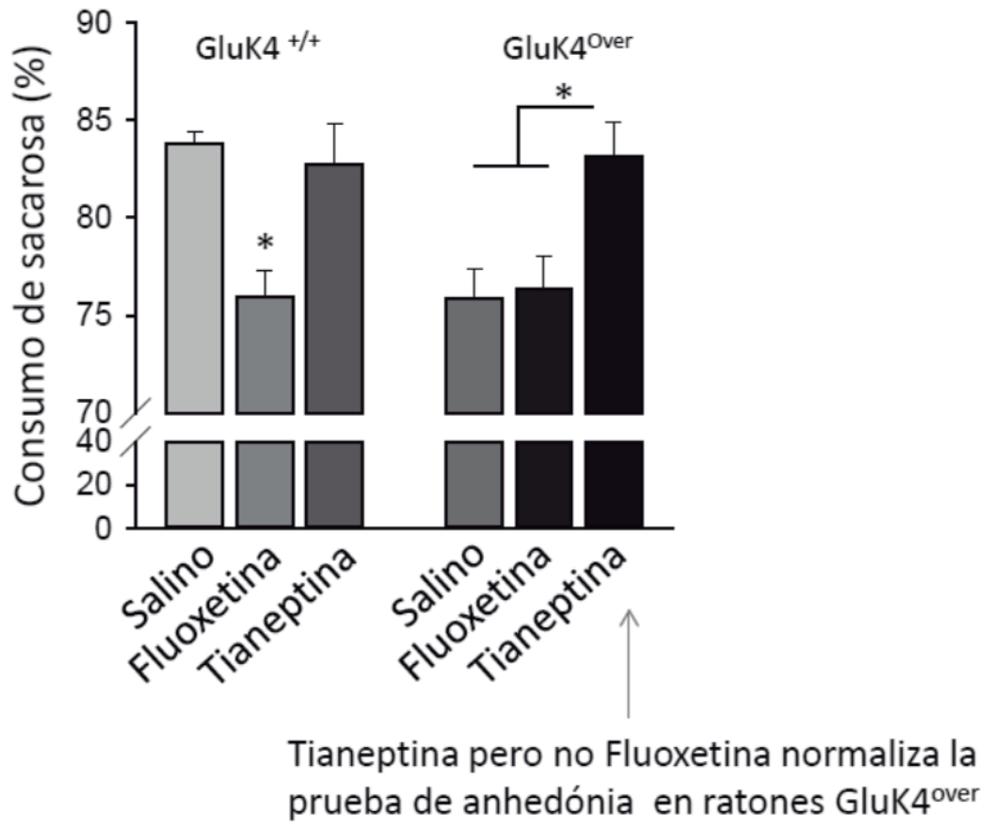


FIG. 9

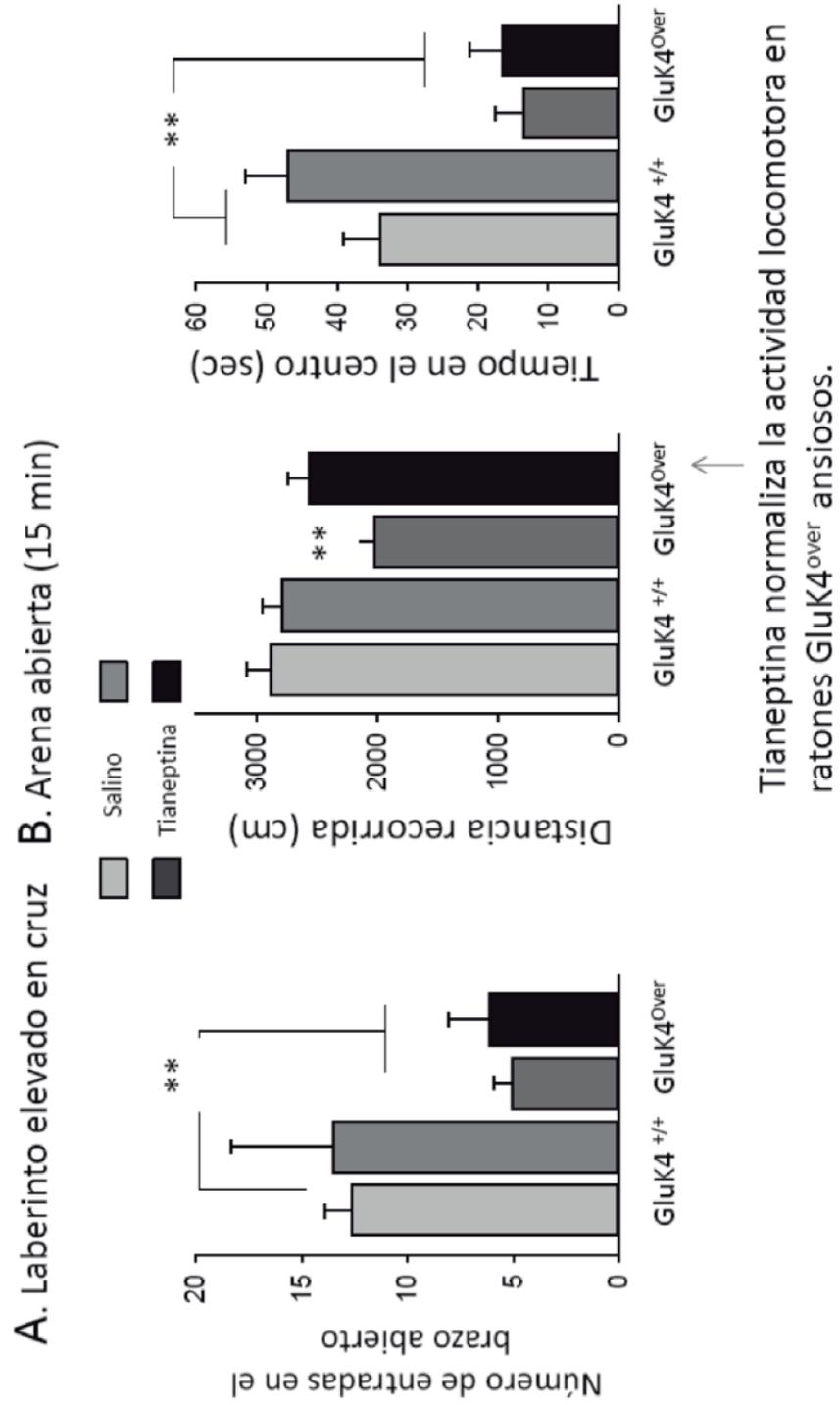


FIG. 10

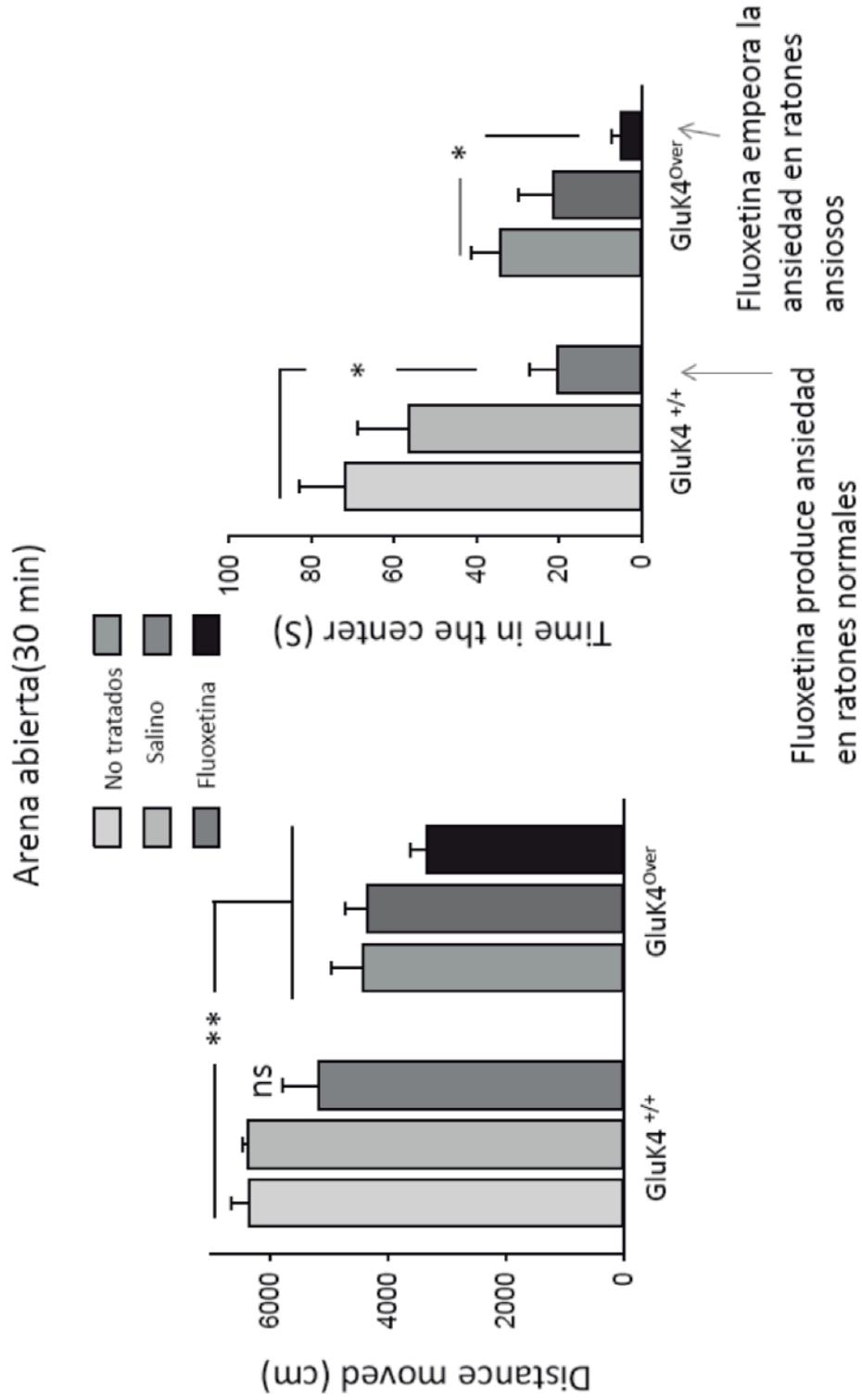


FIG. 11

ES 2 561 728 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

<120> MODELO ANIMAL NO HUMANO PARA DESÓRDENES DEL ESPECTRO AUTISTA, ANSIEDAD Y/O DEPRESIÓN

<130> ES1641.993

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 956

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Leu
1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
100 105 110

Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Arg
115 120 125

Phe Gln Leu Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
130 135 140

Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
145 150 155 160

Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
165 170 175

Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
180 185 190

Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
1

ES 2 561 728 B1

Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu
 485 490 495
 Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
 500 505 510
 Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
 515 520 525
 His Met Gly Arg Arg Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
 530 535 540
 Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
 545 550 555 560 565
 Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
 565 570 575
 His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590
 Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
 595 600 605
 Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
 610 615 620
 Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
 625 630 635 640
 Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Glu Val Pro Ile Glu Ser Val
 645 650 655
 Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
 660 665 670
 Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
 675 680 685
 Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
 690 695 700
 Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
 705 710 715 720
 Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
 725 730 735
 Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
 740 745 750

ES 2 561 728 B1

Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
755 760 765

Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
770 775 780

Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
785 790 795 800

Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
805 810 815

Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
820 825 830

His Ser Glu Ala Ser Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Met Thr Glu
835 840 845

Leu Arg Ser Ile Ile Leu Cys Gln Asp Asn Ile His Pro Arg Arg Arg
850 855 860

Arg Ser Gly Gly Leu Pro Pro Gln Pro Pro Val Leu Glu Glu Arg Arg
865 870 875 880

Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
885 890 895

Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val
900 905 910

Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
915 920 925

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
930 935 940

Glu Trp Asp Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
945 950

<210> 2
<211> 3312
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

<400> 2
cttttctggt tcttggtgtc ccggagcgtt atgtcatgcc cagaccagca gagggctcca 60
tgaggagtta tagaagatgc cccgtgtctc tgctcctctg gtgctgcttc ctgcttggtc 120
cttgatggtg gcctgtagcc cacactccct gaggatcgtc gctatcttgg atgacccat 180
ggagtgcagc agaggggaac ggctctccat caccctggcc aagaaccgca tcaaccgcgc 240
accagagagg ctgggcaagg caaaagtcga agtggacatc tttgagcttc tcagagacag 300

ES 2 561 728 B1

cgagtacgaa actgcagaaa ccatgtgtca gatcctcccc aaggagtggtg tgcgtgtcct 360
 gggaccgtcg tccagcccag cctccagctc catcatcagc aacatctgtg gagagaagga 420
 ggtccctcat ttcaaagtgg ccccagagga gtttgtcagg ttccaactcc agagattcac 480
 caccctgaac cttcacccca gcaacaccga catcagcgtg gctgtggctg ggatcctgaa 540
 cttcttcaac tgcaccaccg cctgcctcat ctgtgccaaa gcagaatgcc ttttaaact 600
 ggagaagctg ctccggcaat tccttatctc caaggacaca ctgtcgggtcc ggatgctgga 660
 tgacacacgg gacccactc cgctcctcaa ggagatccgg gatgacaaga cagctactat 720
 catcatccat gccaacgcct ccatgtcgca caccatctc ctgaaggcag ctgaactggg 780
 gatggtgtca gcctattaca cctacatctt caccaatctg gagttctccc tccagagaat 840
 ggacagcctt gtggatgata gagtcaacat cttaggattt tccattttca accaatccca 900
 tgctttctt caagagttct cccagagcct caaccaatcc tggcaggaga actgtgacca 960
 cgtgccctt accggccctg cgttgcctc agccctactg tttgacgctg tctacgctgt 1020
 ggtgacagcg gtacaggaac tgaaccggag ccaggaaatt ggcgtgaagc ccctgtcctg 1080
 tggctcggcc cagatctggc agcatggcac cagcctcatg aactacctgc gcatggtaga 1140
 attggaaggt cttaccggcc acattgaatt caacagcaaa ggccagaggt ccaactatgc 1200
 cttgaaaatc ttacagttca ccaggaatgg gtttcggcag attggccagt ggcattgtggc 1260
 agagggcctc agcatggaca gccgcctcta cgcctccaac atctctgaca gtctcttcaa 1320
 caccaccctg gtcgtcacca ccatcctgga aaaccatac ctaatgctga aggggaacca 1380
 ccaggacatg gaaggcaatg accggtacga gggattctgc gtggacatgc tcaaggagtt 1440
 ggctgagatc ctacggttca actacaagat ccgcctcgtt ggggatgggtg tttacggcgt 1500
 acctgaggcc aacggcacct ggacgggcat ggttggggag ctgatcgctc ggaaagcaga 1560
 tctggctgtg gcgggctca ccatcacagc tgaacgtgag aaagtgattg atttctccaa 1620
 gccgttcattg acgctgggaa ttagtattct ttacagagtt catatgggac gcagaccggg 1680
 ctatttctcc tttctggacc cttttctcc aggagtctgg ctcttcatgc ttctagctta 1740
 tctggctgtc agctgtgtcc tcttctggt ggctcggtta actccttatg agtggtacag 1800
 tccacatcct tgtgcacagg gccggtgtaa tctcctggtc aaccagtact ctctgggcaa 1860
 cagcctctgg tttccagtgg gaggcttcat gcagcaaggc tccaccatcg ccccgcgggc 1920
 tttgtccaca cgctgcgtca gtggtgtctg gtgggccttc acgttgatca tcatctcatc 1980
 gtacacagcc aacctggcag cttcctgac ggtgcagcgc atggaagtgc ccatcgagtc 2040
 tgtggatgac ctggctgacc agaccgcat tgagtatggc acgattcacg gaggctccag 2100
 catgacctt ttccaaaatt cccgctacca gacctaccag cgcattgtgga attacatgta 2160
 ctccaagcag cccagtgtgt ttgtgaagag cacagaggag ggaattgcca ggggtgttgaa 2220
 ttccaactac gccttctgc tggagtccac catgaacgag tactaccggc agaggaactg 2280
 caacctcact cagattgggg gcctgctgga caccaagggc tatgggattg gcatgccagt 2340
 cggctcagtg ttccgggatg agttcgacct ggccattctc cagctgcagg agaacaaccg 2400

ES 2 561 728 B1

cctggagatt ctgaagcggg agtgggtggga agggggaaaa tgtcccaagg aggaggacca 2460
 cagagccaaa ggcctgggaa tggagaatat tgggtggaatc tttgtgggtc ttattttgtgg 2520
 cttaatagtg gccattttta tggctatgct ggagttttta tggactctca gacactcaga 2580
 agcatcagag gtgtctgtgt gtcaggagat gatgactgag ctgctcagca tcctcctgtg 2640
 ccaggacaat atccatcccc ggaggcggcg ctctggaggc ctgccacccc agcccccggt 2700
 cctggaggag cgccggccca ggggtacagc gacgctcagc aatggcaagc tatgtggcgc 2760
 cggggagccg gaccaactgg cgagagact ggctcaggag gccgccctgg tggcccagg 2820
 ctgcacgcac atccgcgtgt gcccggagtg ccgcccttc cagggcctgc gggctcgacc 2880
 gtcgccagcg cgagcgagg agagcctgga gtgggacaag accaccaaca gcagcgagcc 2940
 tgagtagtgg cggcgaagga ccgtggagcc aggcggggag gcgggagggc taatgttaca 3000
 acctccttct ctccgattga agattcagtg actttacaaa gtcactgatg gccagctag 3060
 ggcggatccc gccctatctg agacttgcaa acacgtggca gagacattgt ccctcttggg 3120
 cacaaggacc catctcctcc agaggtctt tcctcacat tcaaaaacat ggattctggg 3180
 tagtggggcc ctgctgagag agcagtcaa gaaattgatg gtatcatcag ttggattacc 3240
 ccctaggaag gggccattgt accctgggtc tagttcttac aggaaaaaaaa aaattaaact 3300
 caacagggaa gg 3312

<210> 3
 <211> 765
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Val
 1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
 20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
 35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
 50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
 85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
 100 105 110

ES 2 561 728 B1

Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Lys
 115 120 125
 Phe Gln Phe Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
 130 135 140
 Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160
 Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
 165 170 175
 Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
 180 185 190
 Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
 195 200 205
 Asp Asp Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser
 210 215 220
 His Thr Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp
 245 250 255
 Ser Leu Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn
 260 265 270
 Gln Ser His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Asn Gln Ser
 275 280 285
 Trp Gln Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300
 Ser Ala Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln
 305 310 315 320
 Glu Leu Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly
 325 330 335
 Ser Ala Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg
 340 345 350
 Met Val Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys
 355 360 365
 Gly Gln Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn
 370 375 380
 Gly Phe Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Glu Gly Leu Ser Met

ES 2 561 728 B1

Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
675 680 685

Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
705 710 715 720

Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
725 730 735

Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
740 745 750

Met Pro Val Gly Met Arg Glu Arg Asn Ser Leu Phe Gly
755 760 765

<210> 4
<211> 956
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Leu
1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
100 105 110

Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Arg
115 120 125

Phe Gln Leu Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
130 135 140

ES 2 561 728 B1

Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160

Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
 165 170 175

Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
 180 185 190

Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
 195 200 205

Asp Asp Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser
 210 215 220

His Thr Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr
 225 230 235 240

Tyr Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp
 245 250 255

Ser Leu Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn
 260 265 270

Gln Ser His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ser Gln Ser Leu Asn Gln Ser
 275 280 285

Trp Gln Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300

Ser Ala Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln
 305 310 315 320

Glu Leu Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly
 325 330 335

Ser Ala Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg
 340 345 350

Met Val Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys
 355 360 365

Gly Gln Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn
 370 375 380

Gly Phe Gln Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Glu Gly Leu Ser Met
 385 390 395 400

Asp Ser Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Ser Leu Phe Asn Thr
 405 410 415

Thr Leu Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 10

ES 2 561 728 B1

420 425 430
 Gly Asn His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys
 435 440 445
 Val Asp Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys
 450 455 460
 Ile Arg Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly
 465 470 475 480
 Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu
 485 490 495
 Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
 500 505 510
 Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
 515 520 525
 His Met Gly Arg Arg Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
 530 535 540
 Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
 545 550 555 560 565
 Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
 565 570 575
 His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590
 Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
 595 600 605
 Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
 610 615 620
 Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
 625 630 635 640
 Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Glu Val Pro Ile Glu Ser Val
 645 650 655
 Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
 660 665 670
 Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
 675 680 685
 Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
 690 695 700

ES 2 561 728 B1

Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
705 710 715 720

Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
725 730 735

Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
740 745 750

Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
755 760 765

Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
770 775 780

Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
785 790 800

Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
805 810 815

Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
820 825 830

His Ser Glu Ala Ser Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Thr Glu
835 840 845

Leu Arg Asn Ile Ile Leu Cys Gln Asp Asn Ile His Pro Arg Arg Arg
850 855 860

Arg Ser Gly Gly Leu Pro Pro Gln Pro Pro Val Leu Glu Glu Arg Arg
865 870 875 880

Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
885 890 895

Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val
900 905 910

Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
915 920 925

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
930 935 940

Glu Trp Asp Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
945 950 955

<210> 5
<211> 956
<212> PRT

ES 2 561 728 B1

<213> Nannospalax galili

<400> 5

Met Pro Pro Val Leu Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Val Trp Leu Leu
1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
100 105 110

Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Lys
115 120 125

Phe Gln Phe Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
130 135 140

Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
145 150 155 160

Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
165 170 175

Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
180 185 190

Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
195 200 205

Asp Asp Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser
210 215 220

His Thr Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr
225 230 235 240

Tyr Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp
245 250 255

Ser Leu Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn
13

ES 2 561 728 B1

260 265 270
 Gln Ser His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Asn Gln Ser
 275 280 285
 Trp Gln Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300
 Ser Ala Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln
 305 310 315 320
 Glu Leu Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly
 325 330 335
 Ser Ala Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg
 340 345 350
 Met Val Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys
 355 360 365
 Gly Gln Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn
 370 375 380
 Gly Phe Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Asp Gly Leu Ser Met
 385 390 395 400
 Asp Ser Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Ser Leu Phe Asn Thr
 405 410 415
 Thr Leu Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 420 425 430
 Gly Asn His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys
 435 440 445
 Val Asp Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys
 450 455 460
 Ile Arg Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly
 465 470 475 480
 Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ser Arg Lys Ala Asp Leu
 485 490 495
 Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
 500 505 510
 Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
 515 520 525
 His Met Gly Arg Arg Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
 530 535 540

ES 2 561 728 B1

Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
 545 550 555 560

Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
 565 570 575

His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590

Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
 595 600 605

Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
 610 615 620

Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
 625 630 635 640

Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Glu Val Pro Ile Glu Ser Val
 645 650 655

Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
 660 665 670

Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
 675 680 685

Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
 690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
 705 710 715 720

Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
 725 730 735

Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
 740 745 750

Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
 755 760 765

Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
 770 775 780

Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
 785 790 795 800

Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
 805 810 815

ES 2 561 728 B1

Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
 820 825 830

His Ser Glu Ala Thr Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Thr Glu
 835 840 845

Leu Arg Asn Ile Val Leu Cys Gln Asp Ser Ile His Pro Arg Arg Arg
 850 855 860

Arg Ser Gly Val Pro Pro Pro Arg Pro Pro Val Pro Glu Glu Arg Arg
 865 870 875 880

Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
 885 890 895

Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val
 900 905 910

Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
 915 920 925

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
 930 935 940

Glu Trp Asp Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
 945 950 955

<210> 6
 <211> 956
 <212> PRT
 <213> Equus przewalskii
 <400> 6

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Val
 1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
 20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
 35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
 50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
 85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
 16

ES 2 561 728 B1

Gly Phe Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Asp Gly Leu Ser Met
 385 390 395 400
 Asp Ser Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Ser Leu Phe Asn Thr
 405 410 415
 Thr Leu Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 420 425 430
 Gly Asn His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys
 435 440 445
 Val Asp Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys
 450 455 460
 Ile Arg Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly
 465 470 475 480
 Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu
 485 490
 Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
 500 505 510
 Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
 515 520 525
 His Met Gly Arg Lys Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
 530 535 540
 Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
 545 550 555 560
 Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
 565 570 575
 His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590
 Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
 595 600 605
 Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
 610 615 620
 Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
 625 630 635 640
 Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Asp Val Pro Ile Glu Ser Val
 645 650 655

ES 2 561 728 B1

Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
 660 665 670
 Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
 675 680 685
 Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
 690 695 700
 Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
 705 710 715 720
 Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
 725 730 735
 Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
 740 745 750
 Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
 755 760 765
 Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
 770 775 780
 Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
 785 790 795 800
 Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
 805 810 815
 Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
 820 825 830
 His Ser Glu Ala Thr Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Thr Glu
 835 840 845
 Leu Arg Ser Ile Ile Leu Cys Gln Asp Ser Val His Pro Arg Arg Arg
 850 855 860
 Arg Ala Gly Val Pro Pro Pro Arg Pro Pro Ile Pro Glu Glu Arg Arg
 865 870 875 880
 Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
 885 890 895
 Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala His Glu Ala Ala Leu Val
 900 905 910
 Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
 915 920 925

ES 2 561 728 B1

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
 930 935 940

Glu Trp Glu Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
 945 950 955

<210> 7
 <211> 922
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 7

Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala Lys Asn
 1 5 10 15

Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val Glu Val
 20 25 30

Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala Glu Thr
 35 40 45

Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly Pro Ser
 50 55 60

Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly Glu Lys
 65 70 75 80

Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Lys Phe Gln
 85 90 95

Leu Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr Asp Ile
 100 105 110

Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr Thr Ala
 115 120 125

Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu Lys Leu
 130 135 140

Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg Met Leu
 145 150 155 160

Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg Asp Asp
 165 170 175

Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser His Thr
 180 185 190

Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr Tyr Thr
 195 200 205

Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp Ser Leu
 210 215 220

ES 2 561 728 B1

Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn Gln Ser
 225 230 235 240
 His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Asn Gln Ser Trp Gln
 245 250 255
 Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser Ser Ala
 260 265 270
 Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln Glu Leu
 275 280 285
 Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly Ser Ala
 290 295 300
 Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg Met Val
 305 310 315 320
 Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys Gly Gln
 325 330 335
 Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn Gly Phe
 340 345 350
 Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Glu Gly Leu Ser Met Asp Ser
 355 360 365
 Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu
 370 375 380
 Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys Gly Asn
 385 390 395 400
 His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys Val Asp
 405 410 415
 Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys Ile Arg
 420 425 430
 Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly Thr Trp
 435 440 445
 Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu Ala Val
 450 455 460
 Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp Phe Ser
 465 470 475 480
 Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val His Met
 485 490 495

ES 2 561 728 B1

Gly Arg Arg Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser Pro Gly
500 505 510

Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys Val Leu
515 520 525

Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro His Pro
530 535 540

Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser Leu Gly
545 550 555 560

Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly Ser Thr
565 570 575

Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val Trp Trp
580 585 590

Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu Ala Ala
595 600 605

Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Glu Val Pro Ile Glu Ser Val Asp Asp
610 615 620

Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly Gly Ser
625 630 635 640

Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln Arg Met
645 650 655

Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys Ser Thr
660 665 670

Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe Leu Leu
675 680 685

Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn Leu Thr
690 695 700

Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly Met Pro
705 710 715 720

Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu Gln Leu
725 730 735

Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp Glu Gly
740 745 750

Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu Gly Met
755 760 765

ES 2 561 728 B1

Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu Ile Val
 770 775 780

Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg His Ser
 785 790 795 800

Glu Ala Thr Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Ser Glu Leu Arg
 805 810 815

Gly Ile Ile Leu Cys Gln Asp Ser Ile His Pro Arg Arg Arg Arg Ala
 820 825 830

Gly Val Pro Gln Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Glu Arg Arg Pro Arg
 835 840 845

Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly Glu Pro
 850 855 860

Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val Ala Arg
 865 870 875 880

Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe Gln Gly
 885 890 895

Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu Glu Trp
 900 905 910

Glu Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
 915 920

<210> 8
 <211> 956
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 8

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Val
 1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
 20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
 35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
 50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
 85 90 95

ES 2 561 728 B1

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
 100 105 110
 Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Arg
 115 120 125
 Phe Gln Leu Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
 130 135 140
 Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160
 Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
 165 170 175
 Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
 180 185 190
 Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
 195 200 205
 Asp Asp Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser
 210 215 220
 His Thr Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp
 245 250 255
 Ser Leu Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn
 260 265 270
 Gln Ser His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ser Gln Ser Leu Asn Gln Ser
 275 280 285
 Trp Gln Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300
 Ser Ala Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln
 305 310 315 320
 Glu Leu Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly
 325 330 335
 Ser Ala Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg
 340 345 350
 Met Val Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys
 355 360 365

ES 2 561 728 B1

Gly Gln Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn
 370 375 380

Gly Phe Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Glu Gly Leu Ser Met
 385 390 395 400

Asp Ser Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Ser Leu Phe Asn Thr
 405 410 415

Thr Leu Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 420 425 430

Gly Asn His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys
 435 440 445

Val Asp Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys
 450 455 460

Ile Arg Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly
 465 470 475 480

Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu
 485 490 495

Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
 500 505 510

Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
 515 520 525

His Met Gly Arg Arg Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
 530 535 540

Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
 545 550 555 560

Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
 565 570 575

His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
 580 585 590

Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
 595 600 605

Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
 610 615 620

Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
 625 630 635 640

ES 2 561 728 B1

Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Glu Val Pro Ile Glu Ser Val
645 650 655

Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
660 665 670

Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
675 680

Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
705 710 715 720

Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
725 730 735

Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
740 745 750

Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
755 760 765

Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
770 775 780

Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
785 790 795 800

Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
805 810 815

Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
820 825 830

His Ser Glu Ala Ser Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Thr Glu
835 840 845

Leu Arg Ser Ile Ile Leu Cys Gln Asp Ser Ile His Pro Arg Arg Arg
850 855 860

Arg Ser Gly Gly Leu Pro Pro Gln Pro Pro Val Leu Glu Glu Arg Arg
865 870 875 880

Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
885 890 895

Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val
900 905 910

Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
26

ES 2 561 728 B1

915

920

925

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
 930 935 940

Glu Trp Asp Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
 945 950 955

<210> 9
 <211> 956
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<400> 9

Met Pro Arg Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Leu Pro Ala Trp Leu Val
 1 5 10 15

Met Val Ala Cys Ser Pro His Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ile Leu Asp
 20 25 30

Asp Pro Met Glu Cys Ser Arg Gly Glu Arg Leu Ser Ile Thr Leu Ala
 35 40 45

Lys Asn Arg Ile Asn Arg Ala Pro Glu Arg Leu Gly Lys Ala Lys Val
 50 55 60

Glu Val Asp Ile Phe Glu Leu Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Thr Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Met Cys Gln Ile Leu Pro Lys Gly Val Val Ala Val Leu Gly
 85 90 95

Pro Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ser Ser Ile Ile Ser Asn Ile Cys Gly
 100 105 110

Glu Lys Glu Val Pro His Phe Lys Val Ala Pro Glu Glu Phe Val Lys
 115 120 125

Phe Gln Phe Gln Arg Phe Thr Thr Leu Asn Leu His Pro Ser Asn Thr
 130 135 140

Asp Ile Ser Val Ala Val Ala Gly Ile Leu Asn Phe Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160

Thr Ala Cys Leu Ile Cys Ala Lys Ala Glu Cys Leu Leu Asn Leu Glu
 165 170 175

Lys Leu Leu Arg Gln Phe Leu Ile Ser Lys Asp Thr Leu Ser Val Arg
 180 185 190

Met Leu Asp Asp Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Leu Lys Glu Ile Arg
 195 200 205

ES 2 561 728 B1

Asp Asp Lys Thr Ala Thr Ile Ile Ile His Ala Asn Ala Ser Met Ser
 210 215 220
 His Thr Ile Leu Leu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Met Val Ser Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Leu Glu Phe Ser Leu Gln Arg Met Asp
 245 250 255
 Ser Leu Val Asp Asp Arg Val Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ile Phe Asn
 260 265 270
 Gln Ser His Ala Phe Phe Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Asn Gln Ser
 275 280 285
 Trp Gln Glu Asn Cys Asp His Val Pro Phe Thr Gly Pro Ala Leu Ser
 290 295 300
 Ser Ala Leu Leu Phe Asp Ala Val Tyr Ala Val Val Thr Ala Val Gln
 305 310 315 320
 Glu Leu Asn Arg Ser Gln Glu Ile Gly Val Lys Pro Leu Ser Cys Gly
 325 330 335
 Ser Ala Gln Ile Trp Gln His Gly Thr Ser Leu Met Asn Tyr Leu Arg
 340 345 350
 Met Val Glu Leu Glu Gly Leu Thr Gly His Ile Glu Phe Asn Ser Lys
 355 360 365
 Gly Gln Arg Ser Asn Tyr Ala Leu Lys Ile Leu Gln Phe Thr Arg Asn
 370 375 380
 Gly Phe Arg Gln Ile Gly Gln Trp His Val Ala Glu Gly Leu Ser Met
 385 390 395 400
 Asp Ser Arg Leu Tyr Ala Ser Asn Ile Ser Asp Thr Leu Phe Asn Thr
 405 410 415
 Thr Leu Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 420 425 430
 Gly Asn His Gln Glu Met Glu Gly Asn Asp Arg Tyr Glu Gly Phe Cys
 435 440 445
 Val Asp Met Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Leu Arg Phe Asn Tyr Lys
 450 455 460
 Ile Arg Leu Val Gly Asp Gly Val Tyr Gly Val Pro Glu Ala Asn Gly
 465 470 475 480

ES 2 561 728 B1

Thr Trp Thr Gly Met Val Gly Glu Leu Ile Ala Arg Lys Ala Asp Leu
485 490 495

Ala Val Ala Gly Leu Thr Ile Thr Ala Glu Arg Glu Lys Val Ile Asp
500 505 510

Phe Ser Lys Pro Phe Met Thr Leu Gly Ile Ser Ile Leu Tyr Arg Val
515 520 525

His Met Gly Arg Lys Pro Gly Tyr Phe Ser Phe Leu Asp Pro Phe Ser
530 535 540

Pro Gly Val Trp Leu Phe Met Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Val Ser Cys
545 550 555 560

Val Leu Phe Leu Val Ala Arg Leu Thr Pro Tyr Glu Trp Tyr Ser Pro
565 570 575

His Pro Cys Ala Gln Gly Arg Cys Asn Leu Leu Val Asn Gln Tyr Ser
580 585 590

Leu Gly Asn Ser Leu Trp Phe Pro Val Gly Gly Phe Met Gln Gln Gly
595 600 605

Ser Thr Ile Ala Pro Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Val Ser Gly Val
610 615 620

Trp Trp Ala Phe Thr Leu Ile Ile Ile Ser Ser Tyr Thr Ala Asn Leu
625 630 635 640

Ala Ala Phe Leu Thr Val Gln Arg Met Asp Val Pro Ile Glu Ser Val
645 650 655

Asp Asp Leu Ala Asp Gln Thr Ala Ile Glu Tyr Gly Thr Ile His Gly
660 665 670

Gly Ser Ser Met Thr Phe Phe Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Thr Tyr Gln
675 680 685

Arg Met Trp Asn Tyr Met Tyr Ser Lys Gln Pro Ser Val Phe Val Lys
690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ile Ala Arg Val Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe
705 710 715 720

Leu Leu Glu Ser Thr Met Asn Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg Asn Cys Asn
725 730 735

Leu Thr Gln Ile Gly Gly Leu Leu Asp Thr Lys Gly Tyr Gly Ile Gly
740 745 750

Met Pro Val Gly Ser Val Phe Arg Asp Glu Phe Asp Leu Ala Ile Leu
29

ES 2 561 728 B1

755

760

765

Gln Leu Gln Glu Asn Asn Arg Leu Glu Ile Leu Lys Arg Lys Trp Trp
770 775 780

Glu Gly Gly Lys Cys Pro Lys Glu Glu Asp His Arg Ala Lys Gly Leu
785 790 795 800

Gly Met Glu Asn Ile Gly Gly Ile Phe Val Val Leu Ile Cys Gly Leu
805 810 815

Ile Val Ala Ile Phe Met Ala Met Leu Glu Phe Leu Trp Thr Leu Arg
820 825 830

His Ser Glu Ala Thr Glu Val Ser Val Cys Gln Glu Met Val Thr Glu
835 840 845

Leu Arg Ser Ile Ile Leu Cys Gln Asp Ser Ile His Pro Arg Arg Arg
850 855 860

Arg Ala Ala Val Pro Pro Pro Arg Pro Pro Ile Pro Glu Glu Arg Arg
865 870 875 880

Pro Arg Gly Thr Ala Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Cys Gly Ala Gly
885 890 895

Glu Pro Asp Gln Leu Ala Gln Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val
900 905 910

Ala Arg Gly Cys Thr His Ile Arg Val Cys Pro Glu Cys Arg Arg Phe
915 920 925

Gln Gly Leu Arg Ala Arg Pro Ser Pro Ala Arg Ser Glu Glu Ser Leu
930 935 940

Glu Trp Glu Lys Thr Thr Asn Ser Ser Glu Pro Glu
945 950 955

<210> 10
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleotido a. for the grik4 gene

<400> 10
cttgtagttg aaccgtagga tctcagccaa ctccttgagc atgtc

45

<210> 11
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 561 728 B1

<223> oligonucleotido b. for the grik4 gene

<400> 11

tagcccggtc tgcgtcccat atgaactctg taaagaatac ta

42

<210> 12

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleotido Myc

<400> 12

ctccatttca ttcaagtcct cttcagaaat gagcttttgc tccat

45



- ②① N.º solicitud: 201431268
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.08.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K67/027** (2006.01)
C12N5/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| Y | WO 2013016279 A1 (BETH ISRAEL HOSPITAL et al.) 31/01/2013, todo el documento. | 1-27 |
| Y | GRISWOLD ANTHONY J et al. "Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways" .Human Molecular Genetics (2012), Vol: 21, No: 15, Págs: 3513-3523, Doi: doi:10.1093/hmg/dds164, todo el documento, en particular Tabla 5. Citado en la solicitud. | 1-27 |
| A | POOT MARTIN et al. "Recurrent copy number changes in mentally retarded children harbour genes involved in cellular localization and the glutamate receptor complex.",.European journal of human genetics : EJHG (2010), Vol: 18, No: 1 Págs: 39 - 46 Doi: doi:10.1038/ejhg.2009.120, todo el documento. | 1-27 |
| A | EP 2083267 A1 (UNIV KANAZAWA NAT UNIV CORP et al.) 29/07/2009, todo el documento. | 1-27 |
| A | US 2010077493 A1 (FENG GUOPING) 25/03/2010, todo el documento. | 1-27 |

Categoría de los documentos citados

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.01.2016

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201431268

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.08.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K67/027** (2006.01)
C12N5/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | WO 2011009107 A2 (CHILDRENS MEMORIAL HOSPITAL et al.) 20/01/2011, todo el documento. | 1-27 |
| A | US 2014041062 A1 (LEE MIN GOO et al.) 06/02/2014, todo el documento. | 1-27 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.01.2016

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
2/6

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

C12N, A01K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.01.2016

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-27 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-27 | NO |

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | WO 2013016279 A1 (BETH ISRAEL HOSPITAL et al.) | 31.01.2013 |
| D02 | GRISWOLD ANTHONY J et al. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. Human Molecular Genetics AUG 1 2012 00/08/2012 VOL: 21 No: 15 Pags: 3513-3523 Doi: doi:10.1093/hmg/dds164, todo el documento, en particular Tabla 5. Citado en la solicitud. | 31.07.2012 |
| D03 | POOT MARTIN et al. Recurrent copy number changes in mentally retarded children harbour genes involved in cellular localization and the glutamate receptor complex. European journal of human genetics : EJHG England Jan 2010 00/01/2010 VOL: 18 No: 1 Pags: 39 - 46 Doi: doi:10.1038/ejhg.2009.120, todo el documento. | 31.12.2009 |
| D04 | EP 2083267 A1 (UNIV KANAZAWA NAT UNIV CORP et al.) | 29.07.2009 |
| D05 | US 2010077493 A1 (FENG GUOPING) | 25.03.2010 |
| D06 | WO 2011009107 A2 (CHILDRENS MEMORIAL HOSPITAL et al.) | 20.01.2011 |
| D07 | US 2014041062 A1 (LEE MIN GOO et al.) | 06.02.2014 |

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

La presente invención se refiere a un animal transgénico no humano útil como modelo animal para trastornos del espectro autista, ansiedad y / o depresión. El animal transgénico no humano de la invención comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga integrada de manera estable que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior (prosencéfalo) del animal.

El documento D01 describe un modelo animal no humano para enfermedades o trastornos, en particular el autismo, asociados con una sobreexpresión o una variación del número de copias del gen Ube3a.

El documento D02 se refiere a un estudio de la variación del número de copias mediante el cual se identifican nuevos genes considerados como candidatos a estar implicados en los trastornos del espectro autista o ASDs. Entre los genes citados se menciona el gen GRIK4 (Tabla 5, duplicación de novo).

El documento D03 consiste en un estudio para identificar si la variación del número de copias genes o regiones cromosómicas puede contribuir al complejo espectro de trastornos relacionados con el retraso mental, retraso en el desarrollo y múltiples anomalías congénitas. Según este estudio Los genes implicados en la familia de receptores del glutamato, como GRIK4, presentan un aumento de copias en pacientes con dichos trastornos.

Los documentos D04-D07 describen animales transgénicos utilizados como modelos para el estudio del autismo.

Los documentos D03-D07 se consideran que representan únicamente el estado general de la técnica

1.- NOVEDAD

La reivindicación 1 tiene por objeto un animal transgénico no humano que comprende integrada de manera estable en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4, en el que dicha secuencia de nucleótidos se expresa en el cerebro anterior del animal.

Ninguno de los documentos citados describe un animal transgénico tal y como queda definido en la reivindicación 1. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-27 son nuevas de acuerdo al Art. 6.1 LP 11/1986

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 se considera que representa el estado de la técnica más próximo a la invención. El documento D01 describe un modelo animal no humano para enfermedades o trastornos, en particular el autismo, asociados con una sobreexpresión o una variación del número de copias del gen Ube3a. Los animales transgénicos comprenden una copia o varias copias exógenas de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína UBE3A. En este sentido, el problema técnico subyacente se podría considerar como la provisión de un nuevo animal transgénico útil como modelo para el estudio del autismo. La solución de la invención consiste en el modelo animal de la reivindicación 1 que se caracteriza por tener integrada de manera estable en su genoma una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína GluK4.

Un experto en la materia enfrentado a tal problema encontraría en el estado de la técnica el documento D02 en el que se establece la relación entre la duplicación de novo del gen GRIK4 y los trastornos del espectro autista o ASDs. A la vista de tal relación sería obvio para el experto en la materia intentar obtener un animal transgénico portador de una o varias copias de GRIK4 y lo obtendría con unas expectativas razonables de éxito mediante la aplicación de técnicas habituales y rutinarias propias de la obtención de animales transgénicos. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-27, correspondientes al animal y sus respectivos usos, no cumplen con el requisito de actividad inventiva según queda estipulado en el Art. 8.1 LP 11/1986.