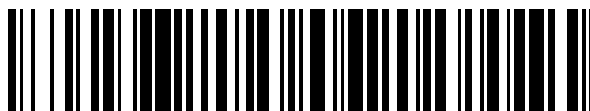


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 852**

51 Int. Cl.:

G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2012 E 12198404 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2579039**

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

30 Prioridad:

12.05.2011 US 201161485488 P

08.06.2011 US 201113155491

19.09.2011 US 201113236117

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

28.02.2018

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

ALESSANDRI HABER, NICOLE M.;

MACDONALD, LYNN;

LACROIX-FRALISH, MICHAEL L. y

MURPHY, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 656 852 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de liberación de neuropéptidos para canales de sodio

5 **Campo de la invención**

Se describen animales no humanos genéticamente modificados que expresan canales de sodio dependientes de voltaje (Na_V) humanos o fragmentos de estos, en particular $\text{Na}_V1.7$ (*Scn9A*). Se describen ratones genéticamente modificados útiles para la identificación y prueba de antagonistas para tratar estados de dolor crónico o trastornos que se asocian con una actividad y/o función aberrante de $\text{Na}_V1.7$. Se describen métodos para generar animales no humanos genéticamente modificados que expresan la proteína $\text{Na}_V1.7$ humana, y, alternativamente, que expresan una proteína $\text{Na}_V1.7$ parcialmente humana. Se describen animales no humanos que no expresan una proteína $\text{Na}_V1.7$ endógena.

15 **Antecedentes de la invención**

Los canales de sodio son proteínas de membrana integrales que forman canales iónicos en la membrana plasmática de las células excitables. Se clasifican como canales de sodio dependientes de voltaje (Na_V), que permiten el flujo de iones Na^+ que media los potenciales de acción en las células excitables; y canales de sodio dependientes de ligando, que se unen a un ligando que desencadena el flujo de iones que conduce a potenciales de acción similares.

Los canales Na_V , al igual que los canales de calcio y potasio, se componen de una subunidad α muy grande y compleja en la superficie de la célula que incluye cuatro dominios (DI-DIV), cada uno con seis segmentos de α -hélice de transmembrana (S1-S6) e incluye un poro que permite el flujo de los iones Na^+ a la célula (Fig. 1; ver, además, Clare 2010 Expert Opin. Investig. Drugs 19(1): 45-62). Para los canales Na_V , un solo gen codifica todos estos dominios. El segmento de transmembrana 4 (S4) dentro de cada dominio de los canales Na_V contiene aminoácidos cargados positivamente (Fig. 1) que actúan como un sensor de voltaje. El bucle intracelular que conecta los dominios III y IV contiene secuencias que, según los informes, participan en la inactivación. Los canales Na_V interactúan con otras proteínas en la superficie celular que se denominan subunidades β , que participan en las funciones de activación dependientes del voltaje y la cinética del canal. Los canales Na_V presentan, según los informes, diversas propiedades funcionales y patrones de expresión distintos, que implican funciones especializadas entre los canales y predisponen a algunos a funciones en la transmisión de señales específicas, por ejemplo, señales de dolor.

A pesar de muchos esfuerzos para dilucidar las propiedades y funciones de los canales Na_V humanos, el tamaño grande y la naturaleza compleja de su estructura dificulta el estudio de los aspectos globales de su actividad biológica y de su participación en la respuesta al dolor. Esta dificultad aumenta por el hecho de que la eliminación global es letal; las crías *Scn9A*^{-/-} mueren poco después del nacimiento, aparentemente, debido a su incapacidad de alimentarse. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos que complementen y potencien los sistemas *in vitro* actuales (por ejemplo, células transfectadas *in vitro* que contienen construcciones que expresan canales Na_V humanos en cultivo) mediante el empleo de enfoques más sensibles biológicamente para la generación de animales y células no humanas que incluyan canales Na_V humanos completos o canales Na_V quiméricos que contengan fragmentos humanos específicos que se asocian con la activación de los canales Na_V que puedan funcionar para facilitar la respuesta al dolor.

La patente núm. WO 2010/087864 describe métodos de ensayo que emplean un antagonista de $\text{Na}_V1.7$ y células que expresan una proteína $\text{Na}_V1.7$ humana o quimérica y su uso en ensayos de tamizaje de alto rendimiento. La patente núm. WO 2007/109324 describe la relación entre las mutaciones en $\text{Na}_V1.7$ y la indiferencia congénita al dolor en humanos, así como métodos para identificar inhibidores de moléculas pequeñas de polinucleótidos y polipéptidos de $\text{Na}_V1.7$.

Breve descripción de la invención

55 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Se describen células, tejidos y animales no humanos genéticamente modificados que expresan una subunidad α de Na_V humana, o un fragmento funcional de esta, en la superficie de una célula. En diversas modalidades, la subunidad α de Na_V es una subunidad α de $\text{Na}_V1.7$.

60 En un aspecto, se describen animales no humanos genéticamente modificados que expresan una subunidad α de $\text{Na}_V1.7$ en la superficie de una célula y proporcionan un sistema *in vivo* para identificar antagonistas del canal, e identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos o síndromes de dolor, tales como, por ejemplo, dolor crónico, eritromelalgia (IEM) y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

65

5 En un aspecto, se describen animales no humanos genéticamente modificados que expresan una subunidad α de $Na_v1.7$ en la superficie de una célula y proporcionan un sistema para probar selectivamente la eficacia y toxicidad de un producto terapéutico en formas mutantes o variantes de la $Na_v1.7$ humana. El agente terapéutico puede ser un compuesto que funciona como un bloqueador de canales de sodio. En una modalidad específica, el compuesto es un compuesto sintético. El compuesto sintético puede seleccionarse de lidocaína, mexiletina, carbamazepina, amitriptilina y bifenilpirazoles, o una combinación de estos. El compuesto puede ser una toxina. La toxina puede seleccionarse de tetrodotoxina y neosaxitoxina o una combinación de estas.

10 Además, se describen animales no humanos genéticamente modificados que expresan una subunidad α de $Na_v1.7$ en la superficie de una célula y proporcionan un sistema para probar selectivamente la funcionalidad (*por ejemplo*, eficacia) y/o toxicidad de combinaciones de agentes terapéuticos en formas mutantes o variantes de una $Na_v1.7$ humana. La combinación de agentes terapéuticos puede comprender proporcionar un efecto sinérgico después de la administración al animal no humano genéticamente modificado. La combinación de agentes terapéuticos puede comprender al menos dos de un compuesto sintético, una toxina natural, o una proteína (*por ejemplo*, un anticuerpo anti- Na_v).

20 En un aspecto, se describen ratones genéticamente modificados que expresan una proteína canal Na_v humana, específicamente, una subunidad α de $Na_v1.7$ humana. Los ratones se modifican genéticamente para incluir el gen de $Na_v1.7$ humano completo o sustancialmente completo.

El gen de $Na_v1.7$ humano puede reemplazar un gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón en el locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón.

25 En un aspecto, se describen ratones genéticamente modificados que expresan una subunidad α de $Na_v1.7$ quimérica, en donde los ratones incluyen una subunidad α de $Na_v1.7$ de ratón modificada con uno o más bucles extracelulares del poro que contienen una secuencia correspondiente de un gen de $Na_v1.7$ humano.

30 La subunidad α de $Na_v1.7$ quimérica puede comprender un bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I que comprende la secuencia correspondiente del gen de $Na_v1.7$ humano. La subunidad α de $Na_v1.7$ quimérica puede comprender un bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III que comprende la secuencia correspondiente del gen de $Na_v1.7$ humano.

35 En un aspecto, se describe un ratón genéticamente modificado que comprende sustancialmente todo el ADN genómico humano que codifica una proteína $Na_v1.7$. En otro aspecto, el ratón genéticamente modificado comprende una porción de ADN genómico humano, y el ratón expresa una proteína $Na_v1.7$ quimérica.

40 La porción de ADN genómico humano puede comprender una secuencia humana que codifica el bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I del gen de $Na_v1.7$ humano. La porción de ADN genómico humano puede comprender una secuencia humana que codifica el bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III del gen de $Na_v1.7$ humano.

En un aspecto, se describe un ratón genéticamente modificado que es capaz de expresar una proteína $Na_v1.7$ quimérica o humana en la superficie de una célula del ratón.

45 La $Na_v1.7$ puede ser quimérica y comprender un bucle extracelular del poro humano. El bucle extracelular del poro humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle extracelular del poro humano puede ser, además, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.

50 La célula puede ser una célula excitable. La célula puede ser una célula no excitable. La célula puede ser una neurona. La célula puede ser una neurona de los ganglios de las raíces dorsales (GRD). La célula puede ser una neurona ganglionar simpática.

El gen de $Na_v1.7$ humano o quimérico puede unirse operativamente a una secuencia líder humana o de ratón. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de ratón.

55 El gen de $Na_v1.7$ humano o quimérico puede unirse operativamente a un promotor humano o de ratón. El promotor puede ser un promotor del gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón.

60 El ratón genéticamente modificado puede comprender un locus del gen de $Na_v1.7$ humano que codifica una proteína $Na_v1.7$ humana. El ratón genéticamente modificado puede comprender un locus del gen de $Na_v1.7$ quimérico que comprende una secuencia humana que codifica un bucle extracelular del poro que es sustancialmente humano. La secuencia humana puede codificar un bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I de la proteína $Na_v1.7$ quimérica. La secuencia humana puede codificar, además, un bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III de la proteína $Na_v1.7$ quimérica.

65

El locus del gen de Nav1.7 puede comprender un fragmento genómico humano que comprende aproximadamente 113 kb de ADN que codifica una proteína Nav1.7 humana. El locus del gen de Nav1.7 puede comprender los exones del 2 al 28 del gen de Nav1.7 humano.

5 El locus del gen de Nav1.7 puede comprender una secuencia de ácido nucleico de un locus del gen de Nav1.7 humano que comprende aproximadamente 10 kb de ADN que codifica un bucle extracelular del poro de una proteína Nav1.7. La secuencia de ácido nucleico puede comprender los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano. El bucle extracelular del poro puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I de una proteína Nav1.7 humana.

10 El locus del gen de Nav1.7 puede comprender una secuencia de ácido nucleico genómica humana que comprende aproximadamente 2.8 kb de ADN que codifica un bucle extracelular del poro de una proteína Nav1.7 humana. La secuencia de ácido nucleico genómica humana puede comprender los exones del 23 al 25 de un gen de Nav1.7 humano. El bucle extracelular del poro puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III de una proteína Nav1.7 humana.

15 El ratón genéticamente modificado puede ser capaz de expresar una proteína Nav1.7 completamente humana. El ratón genéticamente modificado puede ser capaz de expresar una proteína Nav1.7 parcialmente humana. El ratón genéticamente modificado puede ser capaz de expresar una proteína Nav1.7 quimérica que comprende una secuencia extracelular de una proteína Nav1.7 humana.

20 La proteína Nav1.7 parcialmente humana puede comprender un bucle extracelular del poro que contiene una secuencia humana. El bucle extracelular del poro puede seleccionarse del grupo que consiste en el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I, y el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III. El bucle extracelular del poro humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle extracelular del poro humano puede ser, además, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.

25 El ratón puede comprender una célula que expresa una proteína Nav1.7 humana. El ratón puede comprender una célula que expresa una proteína Nav1.7 quimérica que comprende uno o más bucles extracelulares del poro humanos. Los bucles extracelulares del poro humanos pueden seleccionarse del grupo que consiste en el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III, y una combinación de estos. El bucle extracelular del poro humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle extracelular del poro humano puede ser, además, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III. La célula puede ser una célula excitable. La célula puede ser, además, una célula no excitable. La célula puede ser una neurona. La neurona puede ser una neurona de GRD. La neurona puede ser una neurona ganglionar simpática.

30 El ratón puede comprender una combinación de una o más modalidades y/o aspectos descritos en esta descripción.

35 El ratón genéticamente modificado puede ser una cepa C57BL, por ejemplo, seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola. El ratón genéticamente modificado puede ser una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una C57BL/6 mencionada anteriormente. El ratón puede ser, además, una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. La cepa 129 de la mezcla puede ser una cepa 129S6 (129/SvEvTac).

40 En un aspecto, se describe una célula de ratón que se aísla de un ratón como se describe en la presente descripción. La célula puede ser una célula ES. La célula puede ser una célula excitable. La célula puede ser, además, una célula no excitable. La célula puede ser una neurona. La neurona puede ser una neurona de GRD. La neurona puede ser, además, una neurona ganglionar simpática.

45 En un aspecto, se describe una célula; en donde la célula porta una proteína Nav1.7 que comprende una secuencia humana correspondiente a un bucle extracelular del poro de la proteína canal Nav1.7.

50 La célula puede ser una célula neuronal. La célula puede seleccionarse de una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD), una célula ganglionar del trigémino y una neurona ganglionar simpática. La célula puede ser una célula de GRD que expresa una proteína Nav1.7 que comprende un bucle humano que se selecciona del bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de estos. El bucle humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.

55 La célula puede immortalizarse.

En un aspecto, se describe un embrión de ratón, en donde el embrión comprende una célula ES donante que se deriva de un ratón como se describe en la presente descripción.

En un aspecto, se describe un vector de transformación, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómica humana que contiene un gen de Nav1.7 humano o un fragmento de este y un casete de selección. En un aspecto, se describe un vector de transformación, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómica humana de ~113 kb que comprende los exones del 2 al 28 de un gen de Nav1.7 humano y un casete de resistencia a higromicina. En otro aspecto, se describe un vector de transformación, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómica humana de ~10 kb que comprende los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano y un casete de resistencia a neomicina. En otra descripción, se proporciona un vector de transformación, que comprende una secuencia de ácido nucleico genómica humana de ~2.8 kb que comprende los exones del 23 al 25 de un gen de Nav1.7 humano y un casete de resistencia a neomicina.

En un aspecto, se describe una proteína Nav1.7 que se produce por un ratón como se describe en la presente descripción, en donde la proteína Nav1.7 comprende una secuencia humana codificada por un fragmento de un gen de Nav1.7 humano que se selecciona del grupo que consiste en los exones del 2 al 28, exones del 7 al 9 y exones del 23 al 25 de un gen de Nav1.7 humano. En un aspecto, el fragmento del gen de Nav1.7 humano es de los exones del 2 al 28. En otro aspecto, el fragmento del gen de Nav1.7 humano es de los exones del 7 al 9. En otro aspecto, el fragmento humano del gen de Nav1.7 humano es de los exones del 23 al 25.

La proteína Nav1.7 puede reconstituirse en una vesícula. La Nav1.7 puede estar presente en una preparación de vesículas de un ratón como se describe en la presente descripción.

En un aspecto, se describe un método para generar un ratón que expresa una proteína Nav1.7 completamente o parcialmente humanizada en una superficie de una célula excitable, que comprende (a) modificar genéticamente una célula ES de ratón mediante el reemplazo de una o más secuencias de ADN de Nav1.7 de ratón con una o más secuencias de ADN de Nav1.7 humanas para formar una célula ES donante de ratón; (b) introducir la célula ES donante de ratón en un embrión de ratón huésped para formar un embrión modificado; (c) gestar el embrión modificado en un ratón adecuado; y, (d) obtener una cría de ratón que expresa la proteína Nav1.7 completamente o parcialmente humanizada en la superficie de una célula excitable de la cría de ratón.

La una o más secuencias de ADN de Nav1.7 humanas pueden seleccionarse de los exones del 2 al 28 de un gen de Nav1.7 humano, de los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano y de los exones del 23 al 25 de un gen de Nav1.7 humano.

La una o más secuencias de ADN de Nav1.7 humanas pueden ser una secuencia de ADN Nav1.7 humana completa o sustancialmente completa. La secuencia puede ser de los exones del 2 al 28 de un gen de Nav1.7 humano. La secuencia puede ser, además, de los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano. La secuencia puede ser, además, de los exones del 23 al 25 de un gen de Nav1.7 humano.

En un aspecto, se describe un ratón que expresa una subunidad α de Nav1.7 humana a partir de un locus de Nav1.7 endógeno de ratón, en donde el ratón expresa una subunidad β de Nav endógena de ratón, y en donde el ratón expresa una proteína Nav endógena que se selecciona del grupo que consiste en Nav1.6, Nav1.8, y Nav1.9.

La subunidad α de Nav1.7 humana puede ser una variante de la subunidad α de Nav1.7, en donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende una Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G, F1449V, o una combinación de estas.

La subunidad α de Nav1.7 humana puede ser una variante de la subunidad α de Nav1.7, en donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende una R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K, A1632E, o una combinación de estas.

La subunidad α de Nav1.7 humana puede ser una variante de la subunidad α de Nav1.7, en donde la variante comprende una sustitución de aminoácido que comprende una F1200L, I1235L, o una combinación de estas.

La subunidad α de Nav1.7 humana puede ser una subunidad α de Nav1.7 troncada, en donde la proteína subunidad α de Nav1.7 termina en un residuo de aminoácido que se selecciona de 259, 277, 328, 459, 693, 767, 830, 897, 1488, 1659 y 1689. La proteína subunidad α de Nav1.7 troncada puede terminar en el residuo de aminoácido 693. La proteína subunidad α de Nav1.7 troncada puede terminar, además, en el residuo de aminoácido 1488.

En un aspecto, se describe un método para generar una línea celular a partir de una célula que expresa una secuencia de Nav1.7 humana, que comprende obtener una célula que expresa una secuencia de Nav1.7 humana a partir de un ratón como se describe en la presente descripción, aislar y clonar la célula, y mantener la célula aislada y clonada en cultivo. El método puede comprender, además, inmortalizar la célula. La célula puede ser una célula neuronal, *por ejemplo*, una neurona de los ganglios de las raíces dorsales (GRD).

- 5 En un aspecto, se describe un método para generar una línea celular inmortalizada a partir de una célula aislada de un ratón como se describe en la presente descripción, que comprende proporcionar una célula aislada que expresa un canal $Na_v1.7$ humano, variante de humano o quimérico, transfectar la célula aislada con un vector que codifica un oncogén y un marcador de selección (*por ejemplo*, neomicina), cultivar las células en cultivo bajo selección para permitir la expansión de las células que se transfectaron con el vector retroviral, seleccionar una célula transfectada del cultivo que contiene el vector, aislar las células que contienen el vector mediante tripsinización y dilución limitante de la célula transfectada en cultivo, y crear una línea celular clonal a partir del clon aislado que sobrevive a la selección al pasar a un nuevo cultivo.
- 10 La célula aislada puede ser una neurona. La célula aislada puede ser una neurona de GRD.
- El canal $Na_v1.7$ humano puede codificarse por los exones 2 - 28 de un gen de $Na_v1.7$ humano. El canal $Na_v1.7$ quimérico puede codificarse por una secuencia genómica que comprende una secuencia de un gen de $Na_v1.7$ humano que codifica una secuencia extracelular de un gen de $Na_v1.7$ humano.
- 15 La secuencia extracelular puede codificar una secuencia de bucle del poro. La secuencia de bucle del poro puede seleccionarse de un bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I y un bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III. El bucle del poro puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle del poro puede ser, además, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.
- 20 En un aspecto, se describe un método para identificar un antagonista de una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer un ratón como se describe en la presente descripción a un supuesto antagonista de la $Na_v1.7$ humana, y determinar un efecto del antagonista en la función de la $Na_v1.7$ en el ratón.
- 25 La determinación del efecto del antagonista puede comprender medir la presencia o ausencia de un potencial de acción tras la estimulación de una célula que comprende la $Na_v1.7$ humana.
- El antagonista puede ser específico para $Na_v1.7$ y no presentar actividad antagonista con respecto a $Na_v1.6$, $Na_v1.8$, y $Na_v1.9$.
- 30 En un aspecto, se describe un método para determinar la actividad de unión de un agente terapéutico que se une a una secuencia de $Na_v1.7$ humana, que comprende poner en contacto el agente terapéutico con una célula que expresa una secuencia de $Na_v1.7$ humana, y determinar si el agente terapéutico se une a la secuencia de $Na_v1.7$ humana. La célula puede derivarse de un ratón como se describe en la presente descripción.
- 35 La célula puede ser una célula neuronal. La célula puede seleccionarse de una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD), una célula ganglionar del trigémino y una neurona ganglionar simpática. La célula puede ser una célula de GRD que expresa una proteína $Na_v1.7$ que comprende un bucle humano que se selecciona del bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de estos. El bucle humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle humano puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.
- 40 La célula puede immortalizarse.
- El agente terapéutico puede unirse a una $Na_v1.7$ humana pero no se une a una secuencia de $Na_v1.7$ que se selecciona de un ratón, rata, mono y una combinación de estos.
- 50 El agente terapéutico que se une a la secuencia de $Na_v1.7$ humana puede seleccionarse de una benzodiazepina, una benzazepinona, una tetrodotoxina, una bifenilpirazol dicarboxamida, un bloqueador de canales de sodio (*por ejemplo*, amitriptilina, mexiletina, lidocaína, carbamazepina, bifenilpirazoles), un antagonista del tipo T de piperidina (*por ejemplo*, Z123212), y análogos de estos.
- 55 El agente terapéutico que se une a la secuencia de $Na_v1.7$ humana puede seleccionarse de una proteína de unión que comprende una V_H y/o V_L de inmunoglobulina o un fragmento de unión a $Na_v1.7$ de esta, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, una inmunoadhesina, un cuerpo ligando, un pepticuerpo y un anticuerpo de dominio (*por ejemplo*, dAb). En una modalidad específica, el agente terapéutico comprende una región variable de un receptor de células T o de una inmunoglobulina humana. En una modalidad específica, el agente terapéutico es un anticuerpo humano.
- 60 En un aspecto, se describe un sistema *in vitro* para identificar un antagonista de una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende aislar un componente que contiene la $Na_v1.7$ de un ratón como se describe en la presente descripción, exponer el componente a un supuesto antagonista de la $Na_v1.7$ humana, y determinar un efecto del antagonista en la función de $Na_v1.7$. El componente que contiene la $Na_v1.7$ puede ser una fracción de membrana. El componente
- 65

que contiene la Nav1.7 puede ser una célula. El componente que contiene la Nav1.7 puede ser un tejido del ratón.

La determinación del efecto puede comprender medir la presencia o ausencia de una respuesta dependiente de Nav1.7 en una célula derivada de un ratón como se describe en esta descripción. La respuesta puede ser un potencial de acción.

En un aspecto, se describe un método para identificar un modulador del canal Nav1.7 humano, quimérico o variante, que comprende exponer un ratón como se describe en la presente descripción a un compuesto de prueba y detectar la actividad o inactividad del canal Nav1.7. El método puede comprender el ensayo de compuestos de prueba que modulan el flujo de iones de sodio del canal Nav1.7. El método puede comprender el empleo de la tecnología de fijación de membranas. El método puede usarse para identificar compuestos fisiológicamente activos útiles para el tratamiento de una afección por enfermedad del cerebro. La afección por enfermedad del cerebro puede seleccionarse de convulsiones, ataques, trastornos de pánico, trastornos de hiperactividad, depresión, trastornos obsesivos compulsivos, demencia, déficit de memoria, déficit de atención, obesidad, ansiedad, trastornos de la alimentación, adicción y uso indebido de drogas, alteración del impulso sexual, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. La afección por enfermedad puede relacionarse, además, con una respuesta visceral que se origina en el sistema límbico. La respuesta visceral puede seleccionarse de la respiración y la función gastrointestinal.

El modulador puede aumentar la actividad del canal Nav1.7. El modulador puede, además, disminuir la actividad del canal Nav1.7.

El canal Nav1.7 humano, quimérico o variante de humano puede asociarse con un trastorno de dolor. El trastorno de dolor puede seleccionarse de insensibilidad congénita al dolor (CIP), eritromelalgia (IEM), y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

En un aspecto, se describe un método para determinar la probabilidad de enfermedad resultante de una variante del canal Nav1.7, que comprende identificar mutaciones en uno o más sitios dentro de una secuencia de ácido nucleico de un gen de Nav1.7 que se aisló de una célula de un ratón como se describe en la presente descripción que codifica una región N-terminal intracelular, un bucle extracelular en el dominio I, un bucle intracelular entre los dominios I y II, un bucle intracelular entre los dominios II y III, una región intramembrana del dominio II, o cualquier combinación de estos, en donde las mutaciones identificadas codifican una proteína canal Nav1.7 que muestra un cambio en la función que no se observa en un canal Nav1.7 no variante.

El canal Nav1.7 humano, quimérico o variante de humano puede asociarse con un trastorno de dolor. El trastorno de dolor puede seleccionarse de insensibilidad congénita al dolor (CIP), eritromelalgia (IEM), y trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD).

En un aspecto, se describe un método para seleccionar un lote de una preparación farmacéutica que contiene un agente terapéutico que se une a una secuencia de Nav1.7 humana, que comprende exponer una célula que porta una proteína Nav1.7 que comprende al menos una secuencia humana contigua a una muestra del lote de la preparación farmacéutica, determinar si la muestra se une a la célula, y seleccionar un lote que corresponda a la muestra que se une a la al menos una secuencia humana contigua. En una modalidad, la al menos una secuencia humana contigua codifica un bucle extracelular del poro de la proteína Nav1.7. El bucle extracelular del poro de la proteína Nav1.7 puede seleccionarse del bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio II, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III, el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio IV, y una combinación de estos. El bucle extracelular del poro puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I. El bucle extracelular del poro puede ser el bucle que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III.

El lote de la preparación farmacéutica puede comprender un compuesto de unión a Nav1.7 humana no proteico. El lote de la preparación farmacéutica puede comprender una proteína que se une a una Nav1.7 humana. La preparación farmacéutica que comprende una proteína puede incluir un anticuerpo.

La célula que porta una proteína Nav1.7 que comprende al menos una secuencia humana contigua puede estar en un ratón en el momento en que la muestra del lote de la preparación farmacéutica se expone a la célula.

En un aspecto, se describe un método para determinar la eficacia de una proteína de unión a Nav1.7 para mediar una respuesta que resulta de un estímulo nociceptivo, que comprende exponer un ratón como se describe en la presente descripción a la proteína de unión a Nav1.7 y medir la respuesta nociceptiva del ratón al estímulo, en donde una respuesta nociceptiva atenuada del ratón es un indicador de la eficacia de la proteína de unión a Nav1.7.

La eficacia puede determinarse para un lote de la preparación farmacéutica. La eficacia puede determinarse como una etapa de aseguramiento de la calidad o de control de la calidad en la fabricación de la preparación farmacéutica para su uso en humanos.

En un aspecto, se describe un método para interactuar selectivamente con un receptor diana en la superficie de una célula neuronal, que comprende: poner en contacto una célula aislada de un ratón como se describe en la presente descripción con uno o más mediadores de la inflamación, que de esta manera interactúan selectivamente con el receptor diana; y medir la liberación de un neuropéptido.

- 5 El método puede emplearse como un ensayo funcional para seleccionar un antagonista del receptor diana.
- El receptor diana puede ser un canal de sodio. El canal de sodio puede ser Na_v1.7.
- 10 La célula neuronal puede ser una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD).
- El uno o más mediadores de la inflamación pueden seleccionarse de prostaglandina E₂, bradiquinina, capsaicina, protones, pH bajo, y un factor neurotrófico.
- 15 El neuropéptido puede ser un péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP).
- En una modalidad, se describe un método para interactuar selectivamente con una proteína Na_v1.7 en la superficie de una célula de GRD, que comprende exponer un GRD aislado de un ratón como se describe en la presente descripción, a uno o más mediadores de la inflamación, que de esta manera interactúan selectivamente con Na_v1.7 y medir la liberación de CGRP.
- 20 El uno o más mediadores de la inflamación pueden comprender prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina.
- El método puede emplearse como un ensayo funcional para seleccionar un antagonista de Na_v1.7. En una modalidad específica, el antagonista es un anticuerpo.
- 25 En un aspecto, se describe un método para identificar un antagonista de Na_v1.7, que comprende: proporcionar *ex vivo* una célula que expresa una proteína Na_v1.7 humana o quimérica; poner en contacto la célula con un agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica; después de un período de tiempo posterior, poner en contacto la célula con uno o más mediadores de la inflamación; después de otro período de tiempo posterior, determinar la cantidad de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de la célula; y, comparar la cantidad de CGRP liberado de la célula en presencia del agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica con una muestra de referencia, en donde un aumento en la liberación de CGRP respecto a la muestra de referencia indica la inhibición de Na_v1.7; y, determinar si el agente inhibe la función de Na_v1.7.
- 30 La célula puede ser una célula no humana, preferentemente, una célula animal no humana. La célula puede ser una célula humana o no humana que expresa exógenamente la proteína Na_v1.7 humana o quimérica. "Expresión exógena" significa que la célula se modifica genéticamente para expresar la proteína Na_v1.7 humana o quimérica y que no expresará esta proteína sin la modificación genética. La modificación genética puede incluir la introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula que no contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula no humana), o cualquiera de sus precursores. La modificación genética puede incluir, además, la introducción de un gen que codifica la proteína Na_v1.7 humana o quimérica en una célula que ya contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula humana), o cualquiera de sus precursores, en donde el gen introducido está bajo el control de un promotor o promotores diferentes de aquellos que controlan dicho gen ya presente en el genoma. Como ejemplo, las células humanas que expresan exógenamente una proteína Na_v1.7 humana o quimérica pueden ser células HEK293 modificadas para expresar de manera estable la proteína Na_v1.7 humana.
- 35 El agente puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser humano. El agente puede ser un péptido. El agente puede ser un compuesto orgánico no proteico. El compuesto orgánico no proteico puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos 2-alkil-alkanoicos (por ejemplo, ácido valproico y análogos de este), ácidos 3-alkilamino-alkanoicos (por ejemplo, gabapentina y análogos de este), 1-benzazapin-2-onas, bupivacaína, capsaicinas, flecainida, flunarizina, lidocaína, mexiletina, fenitoína, propafenfenona, prostaglandinas, quinidina, saxitoxina, tetracaína, tetrodotoxina y análogos de estas.
- 40 El uno o más mediadores de la inflamación pueden seleccionarse de prostaglandina E₂, bradiquinina, capsaicina, protones, pH bajo, y un factor neurotrófico. En una modalidad específica, el uno o más mediadores de la inflamación son prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina.
- 45 La célula puede ser una célula neuronal. La célula neuronal puede ser una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD). La célula puede ser una célula de GRD de ratón. La célula puede aislarse de un ratón como se describe en la presente descripción. La célula puede ser una célula de GRD aislada de un ratón como se describe en la presente descripción.
- 50 La cantidad de CGRP liberado en presencia del agente que se une a la proteína Na_v1.7 humana o quimérica puede ser aproximadamente 1.5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces,

5 aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, o de aproximadamente 15 veces a aproximadamente 20 veces más alta que la muestra de referencia. El agente puede ser una molécula no proteica. La molécula no proteica puede ser una toxina que se selecciona de tetrodotoxina y ProTx-II. El agente puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Nav1.7.

10 La muestra de referencia puede contener un bloqueador de canales de sodio. El bloqueador de canales de sodio puede inhibir una o más funciones de una proteína canal de sodio mediante la unión a y la inhibición de la apertura extracelular del poro de la proteína canal. El bloqueador de canales de sodio que inhibe una o más funciones de una proteína canal de sodio mediante la unión a y la inhibición de la apertura extracelular del poro de la proteína canal puede ser una toxina basada en un alcaloide (*por ejemplo*, tetrodotoxina o saxitoxina). El bloqueador de canales de sodio puede inhibir una o más funciones de un canal de sodio mediante la unión a y la inhibición de una porción intracelular del canal. El bloqueador de canales de sodio que inhibe una o más funciones de un canal de sodio mediante la unión a y la inhibición de una porción intracelular del canal puede ser un anestésico local (*por ejemplo*, lidocaína). El bloqueador de canales de sodio que inhibe una o más funciones de un canal de sodio mediante la unión a y la inhibición de una porción intracelular del canal puede ser un anticonvulsivo (*por ejemplo*, gabapentina, carbamazepina, clonazepam, divalproex, lamotrigina, fenitoína, oxcarbazepina, tiagabina, topiramato y ácido valproico).

20 La muestra de referencia puede contener una toxina aislada del veneno de un artrópodo, un invertebrado, un pez, o un reptil. El veneno tóxico puede derivarse de una tarántula (*por ejemplo*, ProTx-II).

25 En un aspecto, se describe un método para identificar un antagonista de Nav1.7, que comprende proporcionar *ex vivo* una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD) que expresa una proteína Nav1.7 humana o quimérica, poner en contacto el GRD con un agente que se une a la proteína Nav1.7 humana o quimérica y esperar un primer período de tiempo, y, después del primer período de tiempo, poner en contacto el GRD con uno o más mediadores de la inflamación y esperar un segundo período de tiempo, determinar la cantidad de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de la célula de GRD, comparar la cantidad de CGRP liberado del GRD en presencia del agente que se une a la proteína Nav1.7 humana o quimérica con una muestra de referencia, en donde un aumento en la liberación de CGRP respecto a la muestra de referencia indica la inhibición de Nav1.7, y determinar si el agente inhibe la función de Nav1.7 en el GRD.

35 La célula de GRD puede ser una célula de GRD no humana. La célula de GRD puede ser, además, una célula de GRD humana o no humana que expresa exógenamente la proteína Nav1.7 humana o quimérica. "Expresión exógena" significa que la célula de GRD se modifica genéticamente para expresar la proteína Nav1.7 humana o quimérica y no expresará esta proteína sin la modificación genética. La modificación genética puede incluir la introducción de un gen que codifica la proteína Nav1.7 humana o quimérica en una célula de GRD que no contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula de GRD no humana), o cualquiera de sus precursores. La modificación genética puede incluir, además, la introducción de un gen que codifica la proteína Nav1.7 humana o quimérica en una célula de GRD que ya contiene dicho gen en su genoma (tal como una célula de GRD humana), o cualquiera de sus precursores, en donde el gen introducido está bajo el control de un promotor o promotores diferentes de aquellos que controlan dicho gen ya presente en el genoma.

45 El agente puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser humano. El agente puede ser un péptido. El agente puede ser un compuesto orgánico.

El uno o más mediadores de la inflamación pueden ser prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina.

50 El GRD puede aislarse de un miembro del grupo que consiste en humanos, ratones, ratas, o monos. El GRD puede aislarse a partir de un ratón como se describe en la presente descripción. El ratón puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad α de Nav1.7 humana o un fragmento de esta que se une operativamente a un promotor de Nav.

55 En un aspecto, se describe un complejo *ex vivo*; en donde el complejo *ex vivo* comprende una célula de ratón que expresa una proteína Nav1.7 que comprende un dominio de transmembrana de ratón y un dominio de bucle humano; y, un antagonista de Nav1.7 unido al bucle humano. En una modalidad, la célula de ratón es una célula inmortalizada. En una modalidad, el antagonista de Nav1.7 comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se une específicamente a un bucle de Nav1.7 humano pero no a un bucle de Nav1.7 de ratón.

60 En un aspecto, se describe un complejo *ex vivo*; en donde el complejo *ex vivo* comprende una membrana o un fragmento de esta que comprende una proteína Nav1.7 que comprende un dominio de transmembrana de ratón y un dominio de bucle humano; y, un antagonista de Nav1.7 unido al bucle humano. En una modalidad, el antagonista de Nav1.7 comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se une específicamente a un bucle de Nav1.7 humano pero no a un bucle de Nav1.7 de ratón.

65

Cualquiera de las modalidades y aspectos descritos en la presente descripción pueden usarse conjuntamente entre sí, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto. Otras modalidades serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ilustrativas y explicativas solamente y no son restrictivas.

Breve descripción de las figuras

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

La **Fig. 2** muestra el locus del gen de $Na_v1.7$ murino (parte superior) con los exones numerados arriba y debajo del locus. El vector de transformación de $Na_v1.7$ de ratón (parte intermedia se usó para reemplazar una región de 81 kb del locus endógeno que abarca los exones 6-28 con un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios *loxP*. El alelo transformado da como resultado un locus de $Na_v1.7$ endógeno eliminado (parte inferior).

La **Fig. 3** muestra el locus de $Na_v1.7$ endógeno eliminado (superior) transformado con un vector de transformación de $Na_v1.7$ humana (parte intermedia). El locus endógeno eliminado previamente transformado con un casete de resistencia a neomicina se reemplazó con un vector de transformación que comprende los exones 2-28 de un locus de $Na_v1.7$ humano. El alelo transformado da como resultado un locus endógeno que expresa la proteína $Na_v1.7$ humana.

La **Fig. 4** muestra el locus de $Na_v1.7$ de ratón (superior) transformado con un vector de transformación de $Na_v1.7$ -DI/S5-S6 humana (parte intermedia). El alelo transformado da como resultado un locus de $Na_v1.7$ endógeno parcialmente humanizado que expresa una proteína $Na_v1.7$ quimérica que incluye un bucle extracelular S5-S6 del poro humano en el dominio I.

La **Fig. 5** muestra el locus de $Na_v1.7$ de ratón (parte superior) transformado con un vector de transformación de $Na_v1.7$ -DIII/S5-S6 humana (parte intermedia). El alelo transformado da como resultado un locus del gen de $Na_v1.7$ endógeno parcialmente humanizado que expresa una proteína $Na_v1.7$ quimérica que incluye un bucle extracelular S5-S6 del poro humano en el dominio III.

La **Fig. 6A** muestra la latencia de retirada de cola (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (golpe de la cola) en cohortes masculinas y femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ humano de longitud completa ($Scn9A^{hum/+}$).

La **Fig. 6B** muestra el umbral de retirada (en gramos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (pellizco de la cola) en cohortes masculinas y femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ humano de longitud completa ($Scn9A^{hum/+}$).

La **Fig. 6C** muestra la latencia de retirada de la pata (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (placa caliente a 52 °C y 55 °C) en cohortes de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones heterocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ humano de longitud completa ($Scn9A^{hum/+}$).

La **Fig. 7A** muestra la latencia de retirada de la cola (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (golpe de la cola) en cohortes femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ quimérico que contiene un bucle extracelular del poro humano que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I ($Scn9A^{3.1/3.1}$).

La **Fig. 7B** muestra el umbral de retirada (en gramos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (pellizco de la cola) en cohortes femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ quimérico que contiene un bucle extracelular del poro humano que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I ($Scn9A^{3.1/3.1}$).

La **Fig. 7C** muestra la latencia de retirada de la pata (en segundos) en respuesta a un estímulo nociceptivo (placa caliente a 52 °C y 55 °C) en cohortes femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ quimérico que contiene un bucle extracelular del poro humano que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I ($Scn9A^{3.1/3.1}$).

La **Fig. 7D** muestra la alodinia mecánica medida como umbral de retirada de la pata (en gramos) antes (condiciones iniciales) y después de la administración (posterior al ACF) del adyuvante completo de Freund en cohortes femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ quimérico que contiene un bucle extracelular del poro humano que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I ($Scn9A^{3.1/3.1}$).

La **Fig. 7E** muestra la hiperalgesia térmica medida como umbral de retirada de la pata (en gramos) antes (condiciones iniciales) y después de la administración (posterior al ACF) del adyuvante completo de Freund en cohortes femeninas de tipo silvestre ($Scn9A^{+/+}$) y ratones homocigóticos para el gen de $Na_v1.7$ quimérico que contiene un bucle extracelular del poro humano que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I ($Scn9A^{3.1/3.1}$).

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

La **Fig. 8** muestra la concentración (pg/ml) de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) liberado de tres poblaciones de ganglios de las raíces dorsales (GRD) aisladas de ratones de tipo silvestre en respuesta a la exposición a una mezcla inflamatoria (IM), 20 minutos de preincubación con TTX 1 μ M seguido de la adición de una mezcla inflamatoria (TTX 1 μ M e IM) o incubación con TTX 1 μ M más una mezcla inflamatoria durante 20 minutos (TTX 1 μ M + IM).

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y frases que se usan en la presente descripción incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa el término o frase.

10 La frase "vector de transformación" o "construcción de transformación" incluye una molécula de polinucleótido que comprende una región de transformación. Una región de transformación comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración de la construcción de transformación en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por medio de recombinación homóloga.

15 Se incluyen, además, las regiones de transformación que transforman mediante el uso de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas del sitio (*por ejemplo*, sitios lox o FRT).

20 En una modalidad específica, la construcción de transformación comprende, además, una secuencia de ácido nucleico o gen de particular interés, un marcador de selección, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácidos nucleicos que permiten la recombinación mediada por la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación en la que participan tales secuencias. En otra modalidad específica, la construcción de transformación comprende, además, un gen de interés, en donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia endógena.

25 El término "reemplazo" incluye en donde una secuencia de ADN se coloca en un genoma de una célula de tal manera que reemplaza una secuencia dentro de un genoma, en el locus de la secuencia genómica, con una secuencia heteróloga (*por ejemplo*, una secuencia humana en un ratón). La secuencia de ADN que se coloca de esta manera puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte del ADN de origen que se usó para obtener la secuencia que se coloca de esta manera (*por ejemplo*, promotores, potenciadores, regiones no traducidas 5' o 3', etc.). Por ejemplo, en diversas modalidades, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena por una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ADN que se coloca de esta manera (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia genómica endógena (*por ejemplo*, la secuencia genómica endógena codifica un canal Nav, y el fragmento de ADN codifica uno o más canales Nav). En diversas modalidades, un gen endógeno o un fragmento de este se reemplaza con un gen humano correspondiente o un fragmento de este. Un gen humano correspondiente o un fragmento de este es un gen humano o un fragmento que es un ortólogo, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, con el gen endógeno o fragmento de este que se reemplaza.

45 La frase "canal Nav" incluye un canal de sodio dependiente de voltaje, *por ejemplo*, un canal Nav1.7. Los genes de canal Nav incluyen una subunidad α que se expresa en la superficie de la célula y sirve como una compuerta que permite el flujo de Na⁺ a la célula a través de un poro formado por segmentos de membrana que son parte de la subunidad α . La subunidad α se asocia con otras subunidades, *por ejemplo*, β 1, β 2, β 3 y β 4, para llevar a cabo los potenciales de acción. Existen varios genes de canal de Nav diferentes y pueden clasificarse por la sensibilidad a la toxina del pez globo (tetrodotoxina o TTX). Los canales sensibles a TTX, es decir, aquellos bloqueados por bajas concentraciones nanomolares de TTX, incluyen Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.7. Los canales resistentes a TTX, es decir, aquellos bloqueados por concentraciones μ M de TTX, incluyen Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9. Dentro de los genes de canal de Nav, se describen subtipos o mutantes en sujetos humanos. A modo de ilustración, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un gen de Nav1.7 humano se proporcionan en las SEQ ID NO: 42 y 43, respectivamente. Al leer esta descripción las personas expertas reconocerán que uno o más genes de canal Nav endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse por uno o más genes de canal Nav heterólogos (*por ejemplo*, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas quiméricas, etc.).

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

65 Una "célula excitable" incluye una célula que participa en la generación de potenciales de acción en la estimulación. Las células excitables ilustrativas incluyen neuronas, miocitos y electrocitos. Las células excitables cambian el potencial eléctrico de sus membranas en la estimulación de manera repentina y reversible para transmitir señales

eléctricas a otras células excitables y proporcionan de esta manera la comunicación de célula a célula. Por ejemplo, la contracción muscular voluntaria se controla por potenciales de acción a través de neuronas que inervan las fibras musculares. En diversas modalidades, los animales no humanos genéticamente modificados de la presente descripción muestran potenciales de acción controlados por la expresión de proteínas Na_v1.7 humanas y/o quiméricas en la superficie de las neuronas en varios tipos de tejidos, *por ejemplo*, músculo, en el animal no humano.

Una "neurona" incluye una célula nerviosa y es una célula especializada que presenta, por ejemplo, excitabilidad eléctrica. Las neuronas, como se describe en la presente descripción, forman uniones de membrana complejas con otras neuronas para formar un contacto y permitir de esta manera que una neurona transmita señales a otra. Tales contactos entre neuronas se denominan en la técnica sinapsis, que pueden ser excitatorias o inhibitorias. Las neuronas pueden ser parte del sistema nervioso central de un animal o encontrarse en la periferia del animal en otro tejido nervioso especializado, *por ejemplo*, en los ganglios. Por ejemplo, algunas neuronas se sitúan en órganos sensoriales tales como la retina y la cóclea.

El término "interrupción" se usa para referirse a cuando un fragmento de ADN se recombina con una secuencia endógena homóloga, *por ejemplo*, un gen o locus del gen. Estas interrupciones de secuencia pueden incluir inserciones, eliminaciones, sustituciones, reemplazos, mutaciones con cambio de sentido, o un desplazamiento del marco de lectura de la secuencia de ADN, o cualquier combinación de estas. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, *por ejemplo*, exones, que pueden ser de un origen distinto al de la secuencia endógena. La interrupción de una secuencia homóloga endógena puede alterar la proteína producida a partir de un gen normal de modo que se inhibe por completo o en parte, o porque la producción de la proteína a partir de un gen alterado puede potenciarse respecto al nivel normal de producción a partir de la secuencia homóloga endógena no interrumpida. En una modalidad, la interrupción da como resultado una carencia de la proteína funcional que se produce a partir de la secuencia homóloga endógena. En otra modalidad, la interrupción no tiene un efecto significativo sobre la expresión del gen.

La frase "locus endógeno" se refiere al locus genético natural que se encuentra en un animal huésped de tipo silvestre que se va a interrumpir, eliminar, reemplazar o alterar. En una modalidad, el locus endógeno se elimina. En otra modalidad, el locus endógeno se altera, en donde una porción del locus endógeno se reemplaza con una secuencia heteróloga. En otra modalidad, el locus endógeno completo o sustancialmente completo se reemplaza con un locus heterólogo. En una modalidad, el locus heterólogo es un locus humano.

El término "heterólogo" cuando se usa conjuntamente con un polipéptido o gen se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos o un ADN que codifica el polipéptido que no se encuentra en el animal huésped no humano. Así, un ratón genéticamente modificado que tiene un gen de canal Na_v humano puede describirse como que tiene un gen de canal Na_v heterólogo. El gen de canal Na_v reemplazado puede detectarse mediante el uso una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia Western, transferencia Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos.

La frase "promotor endógeno" se refiere al promotor que se asocia naturalmente, *por ejemplo*, en un organismo de tipo silvestre, con la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína endógena.

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariontes y eucariontes (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (*por ejemplo*, cepas de *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, etc.), células de micobacterias, células de hongos, células de levaduras (*por ejemplo*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (*por ejemplo*, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (*por ejemplo*, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (*por ejemplo*, COS-7), células de la retina, Vero, CV1, renal (*por ejemplo*, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (*por ejemplo*, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, células de Sertoli, células BRL 3A, células HT1080, células de mieloma, células tumorales, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, *por ejemplo*, una célula de la retina que expresa un gen viral (*por ejemplo*, una célula PER.C6TM).

La frase "animales no humanos" pretende incluir cualquier vertebrado como ciclóstomos, peces óseos, peces cartilaginosos tales como tiburones y rayas, anfibios, reptiles, mamíferos y aves. Los mamíferos adecuados incluyen primates no humanos, cabras, ovejas, cerdos, perros, vacas, y roedores. Los animales no humanos adecuados se seleccionan de la familia de los roedores que incluyen la rata y el ratón. En una modalidad, los animales no humanos son ratones.

El término "conservadora", cuando se usa para describir una sustitución de aminoácido conservadora, incluye la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con

propiedades químicas similares (*por ejemplo*, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable de unirse específicamente a un epítipo diana con una afinidad deseada. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen grupo amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas modalidades, una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa, por ejemplo, en la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas modalidades, se realiza una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet, G.H., Cohen, M.A., y Benner, S.A. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, *Science* 256:1443-45. En algunas modalidades, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

El término "identidad" cuando se usa en conexión con una comparación de secuencias, incluye la identidad tal como se determina mediante una serie de algoritmos diferentes que se conocen en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, las identidades se determinan mediante el uso de un alineamiento (lento) con ClustalW v. 1.83 que emplea una penalización de apertura de interrupción de 10.0, una penalización de extensión de interrupción de 0.1 y mediante el uso de una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios para IgG, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} y un cuarto dominio, C_{H4} , en el caso de las regiones constantes de IgM e IgE. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio de tipo κ o λ (C_{κ} o C_{λ}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, que se denominan regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana, y pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o sitio específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se injertaron en las secuencias marco humanas.

Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueador", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a una molécula diana (*por ejemplo*, $Na_v1.7$) da como resultado la inhibición de al menos una función de la molécula diana. Por ejemplo, no es necesario que la inhibición causada por un anticuerpo neutralizante o bloqueador de $Na_v1.7$ sea completa siempre que sea detectable mediante el uso de un ensayo apropiado. Los ensayos ilustrativos para detectar la inhibición de $Na_v1.7$ se describen en otra parte de esta descripción.

La frase "intervalo micromolar" pretende significar 1-999 micromolar; la frase "intervalo nanomolar" pretende significar 1-999 nanomolar; la frase "intervalo picomolar" pretende significar 1-999 picomolar.

Expresión y función del canal Na_v

Hay nueve miembros conocidos en la familia de los canales Na_v . Los nombres de los genes son SCN1A a SCN11A, y las proteínas respectivas se designan $Na_v1.1$ - $Na_v1.9$. Cada uno se clasifica, además, según la sensibilidad a la toxina del pez globo (tetrodotoxina, o TTX). Se reportó que los nueve canales Na_v presentan diversas propiedades funcionales y patrones de expresión distintos, que implican funciones especializadas entre los canales. La expresión de los canales Na_v puede detectarse, por ejemplo, en neuronas del sistema nervioso central y periférico, miocitos cardíacos, músculo esquelético, células gliales y células de Schwann. El $Na_v1.7$, un canal Na_v sensible a TTX que se conoce, además, como PN1 y SCN9A, se detectó en neuronas simpáticas, células de Schwann, células neuroendocrinas y ganglios de las raíces dorsales (GRD). El $Na_v1.7$ se expresa casi exclusivamente en GRD y se concentra en las puntas de estas neuronas especializadas. Tal distribución predispone a este canal a desempeñar

una función en la transmisión de señales de dolor.

Los canales Na_v contienen una subunidad α (Fig. 1) que forma un poro en la membrana de las células que permite el flujo de iones Na^+ y media de esta manera los potenciales de acción. Esta subunidad α se asocia, además, con una o dos subunidades β , que funcionan en la regulación de la activación del canal. La expresión de la subunidad α en la superficie de la célula parece ser necesaria para la función del canal. Los canales Na_v se abren y cierran a través de un poro, que se compone de los segmentos de transmembrana 5 (S5) y 6 (S6) de cada uno de los dominios (Fig. 1). Es a través de este poro formado por la disposición cíclica de los cuatro dominios en la superficie celular que los iones Na^+ se mueven a la célula y causan la despolarización de la membrana celular. Esta acción cambia el gradiente electroquímico de la célula y genera un potencial de acción, que conduce a la transmisión de señales eléctricas entre las células. Los estudios de mutaciones demostraron que los aminoácidos que forman los bucles que conectan los segmentos de transmembrana tanto en el lado extracelular como en el lado intracelular de la célula regulan la apertura y el cierre del canal en un manera del tipo receptor de compuerta. Tales mutaciones alteran y/o desestabilizan el estado del canal y dejan el canal en un estado "activado" o "desactivado" perpetuo, por lo tanto, causan lo que se denomina canalopatías, *por ejemplo*, hiperexcitabilidad, que conduce a estados de dolor severos y persistentes.

Nav1.7 y vías del dolor

Entre los canales Na_v , el $Nav1.7$ se asocia con activación e inactivación rápidas, y se postula que actúa como un canal de umbral. Los estudios genéticos vinculan al $Nav1.7$ tanto con el dolor severo como con la indiferencia ante el dolor. Por ejemplo, la eritromelalgia (IEM) y el trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD) son el resultado de mutaciones de $Nav1.7$ que aumentan la actividad del canal por desplazamiento de la activación del canal a un potencial más negativo o afectación de la inactivación. Se describen otras mutaciones que conducen a una proteína $Nav1.7$ no funcional y por lo tanto a una completa ausencia de dolor, llamada indiferencia congénita al dolor (CIP). Las mutaciones de CIP, aunque afectan la capacidad de oler, parecen no tener ningún efecto sobre las funciones motoras, cognitivas y cardíacas. Se reportaron varias mutaciones del $Nav1.7$ que se relacionan con IEM, PEPD y CIP y el efecto aberrante resultante en la función de $Nav1.7$. Se sugirió, además, que el $Nav1.7$ tiene un papel en la metástasis debido al hallazgo de que $Nav1.7$ se regula positivamente en algunas líneas celulares de cáncer. Además, se demostró que el factor de crecimiento nervioso (NGF) aumenta los niveles de $Nav1.7$, lo que sugiere una relación con el dolor inflamatorio. En consecuencia, estos hallazgos indican que $Nav1.7$ participa en varios puntos de control críticos para la percepción del dolor, la inflamación y, quizás, la persistencia del cáncer.

Las terapias convencionales que emplean inhibidores no selectivos del canal de sodio tales como, por ejemplo, lidocaína, mexiletina y carbamazepina, muestran algún valor en el tratamiento del dolor, sin embargo tienen limitaciones debido a efectos secundarios motores, cognitivos y cardíacos significativos a partir de su inhibición en los canales Na_v que no participan en la respuesta al dolor. Se encontró que el uso de analgésicos, anticonvulsivos y antiarrítmicos para tratar anomalías de la actividad de Na_v tiene resultados similares. Esto revela la importancia y la necesidad inmediata de inhibidores de Na_v . La identificación de productos terapéuticos que inhiban selectivamente a $Nav1.7$ podría ser eficaz para tratar el dolor y la inflamación en humanos y la evaluación de tales productos terapéuticos requiere un modelo animal adecuado que exprese la proteína $Nav1.7$ humana. La presente invención cumple esta y otras necesidades.

Se demostró que las líneas celulares que expresan de manera estable las proteínas canales Na_v son difíciles de construir y por lo tanto el desarrollo de modelos animales adecuados para dilucidar la función de los canales Na_v e identificar inhibidores específicos de los canales Na_v se ha afectado negativamente. Además, la eliminación del $Nav1.7$ murino es letal, causada por una supuesta disminución en el olfato, que se postula que da como resultado la incapacidad de alimentarse. Las eliminaciones de $Nav1.7$ dentro de subconjuntos de células se lograron y confirmaron una función en los mecanismos de dolor, pero la aplicabilidad de este enfoque no es sin limitación. Un ratón en el que se expresa la proteína $Nav1.7$ humana completa y/o porciones específicas de esta, en diversas modalidades podría usarse para reflejar con precisión los mecanismos y patologías del dolor humano que se asocian con trastornos resultantes de las mutaciones de $Nav1.7$. Tal ratón serviría como una herramienta vital en la ingeniería, análisis y evaluación de terapias para el tratamiento de trastornos de dolor humanos tales como, *por ejemplo*, IEM, PEPD, dolor crónico y agudo, y dolor inflamatorio, al proporcionar un modelo animal capaz de lograr un perfil funcional y de expresión más precisos de los procesos del canal Na_v en humanos. Además, las líneas celulares derivadas de tales ratones serían herramientas excepcionalmente útiles para evaluar los productos terapéuticos humanos.

Ratones que expresan canales $Nav1.7$ heterólogos

Se proporcionan animales no humanos genéticamente modificados que expresan una proteína $Nav1.7$ completamente o parcialmente humana. La proteína $Nav1.7$ puede expresarse en la superficie de las células excitables, *por ejemplo*, neuronas del sistema nervioso del animal.

La modificación genética, en diversas modalidades, comprende una eliminación de un gen de $Nav1.7$ de ratón funcional en su totalidad o en parte, y en algunas modalidades una modificación adicional que comprende un

reemplazo con un gen de $Na_v1.7$ humano en su totalidad o en parte, en donde el animal no humano expresa subunidades β de ratón funcionales. Se proporcionan, además, embriones no humanos genéticamente modificados, células y construcciones de transformación para generar los animales no humanos, embriones no humanos y células.

5 Se proporcionan las composiciones y métodos para generar un ratón que expresa una proteína $Na_v1.7$ humana, que incluye variantes específicas (*por ejemplo*, diferencias de un solo aminoácido), que incluyen composiciones y métodos para generar un ratón que expresa tales genes a partir de un promotor de ratón y una secuencia reguladora de ratón. Los métodos incluyen obtener selectivamente un gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón no funcional (*por ejemplo*, por la eliminación de su subunidad α), y emplear una subunidad α de un gen de $Na_v1.7$ humano en el locus del gen de $v1.7$ endógeno de ratón para expresar un gen de la subunidad α de $Na_v1.7$ humana en un ratón. La eliminación del gen de $Na_v1.7$ de ratón se realiza por eliminación del gen de la subunidad α , pero no de un gen de la subunidad β . El enfoque obtiene selectivamente el gen de la subunidad α de $Na_v1.7$ no funcional mientras mantiene una subunidad β endógena funcional.

15 El enfoque del reemplazo de la subunidad α de $Na_v1.7$ endógena emplea una interrupción relativamente mínima en la transducción natural de señales mediadas por $Na_v1.7$ en el animal, en diversas modalidades, porque la secuencia genómica de las subunidades α de $Na_v1.7$ se reemplazan en un solo fragmento y por lo tanto mantienen la funcionalidad normal al incluir las secuencias reguladoras necesarias. Así, en tales modalidades, la modificación de la subunidad α de $Na_v1.7$ no afecta otros genes de canales Na_v endógenos dependientes de las subunidades β funcionales. Además, en diversas modalidades la modificación no afecta el ensamblaje de un complejo receptor funcional en el que participa una subunidad α de $Na_v1.7$ y una subunidad β endógena, que se cree que es necesaria para la activación adecuada del canal y la modulación de la expresión del canal de las subunidades α de $Na_v1.7$ en la superficie celular y para la señalización corriente abajo resultante de un canal activado. Debido a que las subunidades β no se eliminan, los animales que contienen un reemplazo de un gen de la subunidad α de $Na_v1.7$ endógeno con un gen de la subunidad α de $Na_v1.7$ humano deben ser capaces de procesar las funciones normales del canal Na_v dependiente de voltaje del paso de Na^+ a la célula a través del poro de la subunidad α de $Na_v1.7$ humana presente en la superficie de las neuronas.

30 Una ilustración esquemática (no a escala) de un gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón eliminado se proporciona en la Fig. 2. Como se ilustra, la subunidad α de $Na_v1.7$ de ratón se codifica por 28 exones que abarcan más de 80 kb de secuencia. El gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón se elimina por una construcción de transformación (Vector de transformación de $Na_v1.7$ de ratón) con un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios de recombinación. Este locus endógeno codifica la subunidad α del gen de $Na_v1.7$ de ratón responsable de la generación de potenciales de acción desencadenados por la despolarización de la membrana celular en respuesta al flujo de iones Na^+ al interior de la célula.

Un ratón genéticamente modificado que carece de una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad α del gen de $Na_v1.7$ endógeno puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede generarse un vector de transformación que elimine el gen de $Na_v1.7$ de ratón con un gen de marcador de selección. La Fig. 2 ilustra un genoma de ratón (parte inferior) transformado por una construcción de transformación que tiene un brazo de homología en 5' que contiene la secuencia corriente arriba del exón 6 del locus de $Na_v1.7$ endógeno, seguido de un casete de selección por fármaco (*por ejemplo*, un gen de resistencia a neomicina flanqueado por secuencias *loxP*), y un brazo de homología en 3' que contiene la secuencia corriente abajo del exón 27 del locus de $Na_v1.7$ endógeno. Tras la recombinación homóloga en el locus, el locus de $Na_v1.7$ endógeno se reemplaza por un casete de selección por fármaco (Fig. 2, parte inferior). El locus de $Na_v1.7$ endógeno se elimina de esta manera y da como resultado una célula o animal no humano que no expresa la subunidad α de $Na_v1.7$ endógena. El casete de selección por fármaco puede eliminarse opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (*por ejemplo*, mediante tratamiento con Cre).

50 La modificación genética de un ratón para obtener un gen de $Na_v1.7$ endógeno no funcional, en diversas modalidades, da como resultado un ratón que presenta defectos en los procesos del sistema nervioso, *por ejemplo*, en la transmisión de la información nociceptiva, lo que hace que el ratón sea útil para evaluar la función del gen de $Na_v1.7$ endógeno en la función neuronal normal y trastornada. En diversas modalidades, modificar la subunidad α del gen de $Na_v1.7$ endógeno, pero no las subunidades β , evita la reducción potencial de otros genes de Na_v (*por ejemplo*, $Na_v1.6$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$, etc.) que requieren las subunidades β para regular la activación dependiente de voltaje del canal, y mantiene de esta manera otras funciones y procesos diversos mediados por procesos dependientes de la subunidad β .

60 De acuerdo con los informes, las eliminaciones completas del gen de $Na_v1.7$ endógeno en los ratones es letal. Sin embargo, se lograron eliminaciones en subconjuntos específicos de células y parecen normales. Los ratones de acuerdo con la presente descripción tienen un locus de $Na_v1.7$ endógeno funcionalmente silenciado debido a que carecen de la capacidad de producir una subunidad α de $Na_v1.7$ funcional en la superficie celular.

65 Una ilustración esquemática (no a escala) de un gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón reemplazado con un gen de $Na_v1.7$ humano se proporciona en la Fig. 3. Como se ilustra, un locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón que se eliminó

se reemplaza por una construcción de transformación (Vector de transformación de $Na_v1.7$ humana) con un casete de resistencia a higromicina flanqueado por sitios de recombinación. El locus reemplazado resultante codifica una proteína subunidad α de $Na_v1.7$ humana que se expresa en la superficie de las neuronas en el animal huésped capaz de mediar los potenciales de acción desencadenados por la despolarización de la célula en respuesta al flujo de iones Na^+ en la célula en el animal huésped.

Un ratón genéticamente modificado que expresa una subunidad α de $Na_v1.7$ humana en el locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede generarse un vector de transformación que introduce el gen de $Na_v1.7$ humano con un gen de marcador de selección. La Fig. 3 ilustra un genoma de ratón que comprende un reemplazo del locus de $Na_v1.7$ endógeno (parte inferior). La construcción de transformación contiene un brazo de homología en 5' que contiene la secuencia corriente arriba del locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón, seguido de un fragmento genómico que contiene un gen de $Na_v1.7$ humano, un casete de selección por fármaco (*por ejemplo* un gen de resistencia a higromicina flanqueado en ambos lados por secuencias *loxP*), y un brazo de homología en 3' que contiene la secuencia corriente abajo del locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón. Tras la recombinación homóloga en el locus endógeno, el casete de selección por fármaco se reemplaza por la secuencia contenida en el vector de transformación (parte inferior de la Fig. 3). El locus de $Na_v1.7$ endógeno eliminado se reemplaza de esta manera con un gen de $Na_v1.7$ humano y da como resultado una célula o animal que expresa un gen de $Na_v1.7$ humano. El casete de selección por fármaco puede eliminarse opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (*por ejemplo*, mediante tratamiento con Cre).

Pueden lograrse otras modificaciones en el locus endógeno con un esfuerzo mínimo mediante el uso de técnicas similares para crear un locus que comprende un gen quimérico. Por ejemplo, ilustraciones esquemáticas del reemplazo de dos bucles extracelulares del poro entre los segmentos de transmembrana 5 y 6 de los dominios I y III del gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón se proporcionan en la Fig. 4 y la Fig. 5, respectivamente. Como se ilustra, porciones discretas de un gen de $Na_v1.7$ humano se insertan en el locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón por otras construcciones de transformación (Vector de transformación de $Na_v1.7$ DI/S5-S6 humana y vector de transformación de $Na_v1.7$ DIII/S5-S6 humana) con fragmentos genómicos que codifican cada uno un bucle extracelular de un gen de $Na_v1.7$ humano ubicado en el poro del canal y responsable de permitir el paso de iones Na^+ al espacio intracelular. Tras la recombinación con cualquiera de los vectores de transformación ilustrados, un fragmento genómico del locus de $Na_v1.7$ endógeno, que codifica un bucle extracelular del poro de la proteína $Na_v1.7$ endógena, se reemplaza por un fragmento genómico humano que codifica el bucle del poro correspondiente en una proteína $Na_v1.7$ humana. Esto crea un locus quimérico que produce una proteína $Na_v1.7$ quimérica que comprende bucles extracelulares humanos en el poro de una proteína canal $Na_v1.7$.

Un ratón genéticamente modificado que expresa un bucle extracelular del poro de un canal $Na_v1.7$ humano en el locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede generarse un vector de transformación que introduce un fragmento genómico que codifica un bucle extracelular del poro de un canal $Na_v1.7$ humano con un gen de marcador de selección. Las Fig. 4 y 5 ilustran cada una un genoma de ratón que comprende reemplazos independientes de bucles extracelulares ubicados en el poro de una proteína canal $Na_v1.7$. Cada construcción de transformación contiene un brazo de homología en 5' que contiene la secuencia corriente arriba de la secuencia de $Na_v1.7$ endógena de ratón a reemplazar, seguido de un fragmento genómico que contiene una secuencia humana correspondiente a la secuencia del gen de $Na_v1.7$ endógeno de ratón que codifica un bucle extracelular del poro específico, un casete de selección por fármaco (*por ejemplo*, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado en ambos lados por secuencias *loxP*), seguido de un brazo de homología en 3' que contiene la secuencia corriente abajo de la secuencia de $Na_v1.7$ endógena de ratón. Tras la recombinación homóloga en el locus endógeno con cualquiera de los vectores de transformación, se inserta un fragmento genómico en el locus de $Na_v1.7$ endógeno de ratón lo que da como resultado un locus quimérico capaz de expresar una proteína canal $Na_v1.7$ que comprende una secuencia humana correspondiente a un bucle extracelular del poro (Fig. 4 y 5, parte inferior). El casete de selección por fármaco puede eliminarse opcionalmente mediante la adición posterior de una recombinasa (*por ejemplo*, mediante tratamiento con Cre).

Modelos experimentales de ratones con $Na_v1.7$ humanizada

Los animales no humanos genéticamente modificados que expresan genes de $Na_v1.7$ humanos son útiles, *por ejemplo*, para dilucidar las diversas funciones de $Na_v1.7$ en las células del sistema nervioso, para medir la eficacia de un agente terapéutico que se une a la proteína $Na_v1.7$ que se expresa en la superficie celular, para determinar una función del canal $Na_v1.7$ en mecanismos de dolor y trastornos de dolor, para servir como modelos de dolor agudo y/o dolor crónico, y para servir como parejas de cría para generar otros ratones genéticamente modificados de interés. Son útiles, además, para preparar fracciones de membrana o vesículas que comprenden proteínas $Na_v1.7$ completamente humanas o quiméricas humana-murina, para identificar antagonistas de $Na_v1.7$ humana.

En una modalidad, un ratón de acuerdo con la descripción se usa para determinar el mecanismo de activación del canal que se regula por los bucles extracelulares ubicados en el poro de los canales Na_v humanos. En una modalidad, un ratón de la presente descripción se inyecta con toxinas que se unen a bucles extracelulares del poro de un canal Na_v humano en la superficie celular y, después de un período de tiempo posterior, se somete a un

intervalo de estímulos para activar el disparo de potenciales de acción. La identidad de la toxina se conoce antes de la inyección y los animales se analizan en cuanto a la afectación de las respuestas eléctricas dependientes de Nav1.7 por comparación con las respuestas eléctricas observadas en animales de tipo silvestre.

5 En otro aspecto, se proporcionan animales no humanos genéticamente modificados que comprenden un reemplazo del gen de Nav1.7 endógeno con un gen de Nav1.7 humano. Tales animales son útiles para estudiar la eficacia de los agentes terapéuticos para bloquear la función de Nav1.7. Además, se demostró que la proteína Nav1.7 humana presenta formas mutantes asociadas con la enfermedad (*por ejemplo* IEM, PEPD y CIP). Así, los animales no humanos genéticamente modificados que comprenden un reemplazo del gen de Nav1.7 endógeno con formas mutantes específicas de los genes de Nav1.7 humanos pueden usarse para estudiar trastornos humanos asociados con mutaciones de Nav1.7 en el animal. En una modalidad específica, las formas mutantes de la proteína Nav1.7 humana se asocian con la respuesta al dolor.

15 Las variantes adecuadas incluyen formas mutantes de Nav1.7 humana que se conocen en la técnica. Las variantes asociadas con el trastorno IEM incluyen, por ejemplo, mutaciones que desplazan la activación de Nav1.7 a un potencial más negativo. Las mutaciones de Nav1.7 ilustrativas que conducen a IEM incluyen Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G y F1449V. En una modalidad, la secuencia de Nav1.7 humana comprende una mutación con cambio de sentido que causa el trastorno IEM. En una modalidad específica, la mutación con cambio de sentido que causa el trastorno IEM se selecciona de I848T y L858H.

20 Las variantes asociadas con el trastorno PEPD incluyen, por ejemplo, mutaciones que comprometen la inactivación de una subunidad α de Nav1.7. Se demostró que las mutaciones que causan PEPD desplazan la inactivación rápida en estado estable de una subunidad α de Nav1.7 hacia un estado caracterizado por potenciales más despolarizados que causan un aumento notable en la corriente continua. Se informó que tales mutaciones ocurren, por ejemplo, en los aminoácidos que unen DIII y DIV, que contienen un motivo de inactivación asociado con la inactivación de la subunidad α de Nav1.7. Las mutaciones de Nav1.7 ilustrativas que conducen a PEPD incluyen R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K y A1632E. En una modalidad, la secuencia de Nav1.7 humana comprende una mutación seleccionada de I1461T, M1627K y A1632E.

30 Las variantes asociadas con el trastorno CIP incluyen, por ejemplo, mutaciones sin sentido homocigóticas de un solo nucleótido y mutaciones heterocigóticas combinadas, que incluyen mutaciones sin sentido en un alelo y una mutación por eliminación en el otro alelo. La mutación por eliminación puede ser de secuencias codificantes o no codificantes, la última de las cuales puede conducir a empalmes defectuosos que silencian funcionalmente la subunidad α de Nav1.7. Las mutaciones sin sentido son cambios en la secuencia de ADN, que introducen codones de parada prematuros, y causan que cualquier proteína resultante se acorte anormalmente. Esto puede causar una pérdida de la función en la proteína, ya que las partes críticas de la cadena de aminoácidos ya no se traducen. En consecuencia, los animales no humanos de la presente descripción que comprenden una subunidad α de Nav1.7 humana con una mutación que silencia funcionalmente a la subunidad α de Nav1.7 humana demuestran una ausencia de dolor en respuesta a estímulos nociceptivos.

40 Las mutaciones silenciadoras ilustrativas en un gen de Nav1.7 incluyen mutaciones sin sentido, eliminaciones de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN de Nav1.7, mutaciones en la unión de empalme de los exones y mutaciones de desplazamiento del marco de lectura. En una modalidad, el animal no humano genéticamente modificado es heterocigótico para una mutación silenciadora que conduce a CIP, en donde un alelo de un gen de Nav1.7 comprende una mutación sin sentido y el otro alelo de Nav1.7 comprende una mutación de desplazamiento del marco de lectura seleccionada de F1200L e I1235L. En otra modalidad, el animal no humano genéticamente modificado es homocigótico para una mutación sin sentido que conduce a CIP. En una modalidad, la mutación sin sentido comprende una proteína subunidad α de Nav1.7 truncada que termina en un residuo de aminoácido seleccionado de 259, 277, 328, 459, 693, 767, 830, 897, 1488, 1659 y 1689. En una modalidad específica, la proteína subunidad α de Nav1.7 humana termina en un residuo de aminoácido que se selecciona de 693 y 1488.

55 La expresión de la proteína Nav1.7 de ratón en ratones enteros se analizó mediante el uso de un sistema reportero que comprende una fusión de un gen reportero LacZ con Nav1.7 de ratón. El análisis de la señal de LacZ en ratones enteros reveló que Nav1.7 se expresa en todo el sistema nervioso del ratón, que incluye en el cerebro (incluidos los ganglios del bulbo olfatorio), tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente, médula, colículo, núcleo óptico, corteza cerebral y sustancia gris de la médula espinal (por ejemplo, dorsal/sensorial), ganglios de las raíces dorsales, cadena ganglionar simpática, ganglios del trigémino, ganglio celíaco, plexo nervioso del intestino, y en ganglios más pequeños en todo el cuerpo (por ejemplo, lengua, esófago, tráquea, bronquios, corazón).

60 Así, pueden generarse células, líneas celulares y cultivos celulares a partir de los tejidos mencionados anteriormente como fuente de la proteína Nav1.7 de ratón. Además, los ratones genéticamente modificados de acuerdo con la descripción expresan una Nav1.7 parcialmente o completamente humanizada en los tejidos mencionados anteriormente. Así los tejidos y células de los ratones genéticamente modificados, que incluyen líneas celulares y cultivos celulares, pueden generarse para servir como fuente de Nav1.7 humanizada para su uso en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para ensayar la unión o función de un agonista o antagonista de Nav1.7, particularmente cuando el agonista o antagonista es específico para una secuencia de Nav1.7 humana.

Las células de ratones genéticamente modificados pueden aislarse y usarse de forma ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo durante muchas generaciones. En una modalidad, las células de los ratones genéticamente modificados se immortalizan y se mantienen en cultivo indefinidamente. (*por ejemplo*, en cultivos seriados).

- 5 En un aspecto, los ratones genéticamente modificados se usan para generar ganglios de las raíces dorsales modificados (GRD) que comprenden una o más de las proteínas $Na_v1.7$ modificadas. Los GRD modificados se emplean en ensayos *ex vivo* para determinar el efecto de un agente de unión a $Na_v1.7$ en la función de la proteína $Na_v1.7$ y en la función de otras proteínas, *por ejemplo*, otros miembros de la familia de Na_v . En una modalidad, los
- 10 GRD modificados de un ratón se aíslan y se ensayan para comprobar una o más funciones de $Na_v1.7$ en presencia y ausencia de un agente de unión a $Na_v1.7$ (*por ejemplo*, un agonista o antagonista de $Na_v1.7$). En una modalidad, los GRD modificados se aíslan y ensayan para comprobar la función de uno o más miembros de la familia de Na_v en presencia y ausencia de un agente de unión a $Na_v1.7$. En una modalidad, los GRD modificados se ensayan en presencia del agente de unión para comprobar la función de un canal o proteína de una familia que no es la de Na_v .
- 15 En una modalidad, se proporciona un método para determinar el efecto de un agente de unión a $Na_v1.7$ en un canal de GRD que no es un miembro de la familia de Na_v , que comprende exponer los GRD modificados que comprenden a un agente de unión a $Na_v1.7$, y medir la función de un canal de GRD de un miembro de una familia que no es la de Na_v .
- 20 En otro aspecto, se proporciona un método para determinar el efecto de un producto terapéutico humano en una $Na_v1.7$ humana, en donde el producto terapéutico humano no se une a una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer un GRD modificado al producto terapéutico humano en un ensayo *ex vivo*, y medir un efecto del producto terapéutico humano en una función de la proteína $Na_v1.7$ humana.
- 25 En diversas modalidades y aspectos, se ensaya un GRD o un GRD modificado o se determina una función de una proteína de GRD o una proteína de GRD modificado en un protocolo de fijación de membranas, un protocolo de obtención de imágenes de calcio, un protocolo de tinción sensible a membrana, en un ensayo *ex vivo*.
- 30 En un aspecto, se proporciona un cultivo celular, en donde el cultivo celular comprende una célula de un ratón genéticamente modificado como se describe en la presente descripción, en donde un número sustancial de las células en el cultivo expresa una secuencia de $Na_v1.7$ humana. En una modalidad, las células que expresan la secuencia de $Na_v1.7$ humana se immortalizan. En una modalidad, las células se derivan de un tejido que se selecciona de cerebro (que incluye los ganglios del bulbo olfatorio), tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente, médula, colículo, núcleo óptico, corteza cerebral, sustancia gris de la médula espinal (*por ejemplo*, dorsal/sensorial),
- 35 ganglios de las raíces dorsales, cadena ganglionar simpática, ganglios del trigémino, ganglio celíaco, plexo nervioso del intestino, y en ganglios más pequeños de todo el cuerpo (*por ejemplo*, lengua, esófago, tráquea, bronquios, corazón).
- 40 En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un posible agonista o antagonista de $Na_v1.7$ se une a una proteína $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer el posible agonista o antagonista de $Na_v1.7$ a una célula como se describe en la presente descripción, y determinar si el posible agonista o antagonista de $Na_v1.7$ se une a la célula.
- 45 En una modalidad, el agonista o antagonista de la $Na_v1.7$ humana se selecciona de una proteína, un péptido, y una molécula pequeña (*por ejemplo*, un compuesto orgánico no proteico). En una modalidad específica, la proteína comprende un dominio variable de inmunoglobulina o un fragmento de unión a $Na_v1.7$ de este. En una modalidad específica, la proteína es un anticuerpo anti- $Na_v1.7$ humana.
- 50 En un aspecto, se proporciona un método para determinar si una preparación farmacéutica afecta una función de una $Na_v1.7$ humana, que comprende exponer la preparación farmacéutica a una célula como se proporciona en la presente descripción que expresa una proteína $Na_v1.7$ humana, y medir una función de la $Na_v1.7$ de la célula.
- 55 En una modalidad, la función de $Na_v1.7$ que se mide es la activación de nociceptores primarios. En una modalidad específica, la función que se mide es la liberación del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) por la célula.
- 60 En una modalidad, la preparación farmacéutica comprende una proteína, un péptido, o un análogo peptídico. En una modalidad específica, la proteína comprende un dominio variable de inmunoglobulina o un fragmento de unión a $Na_v1.7$ de este. En una modalidad específica, la proteína es un anticuerpo anti- $Na_v1.7$ humana.
- 65 En un aspecto, se proporciona un ensayo de aseguramiento de la calidad para una preparación farmacéutica que comprende un agente que se une a una secuencia de $Na_v1.7$ humana, que comprende obtener una muestra de una preparación farmacéutica y exponer la preparación a un ratón o a una célula como se describe en la presente descripción, donde el ratón o la célula expresa una secuencia de $Na_v1.7$ humana, y determinar (a) si la preparación farmacéutica se une a la célula, y/o (b) determinar si la preparación farmacéutica afecta a una función de la $Na_v1.7$ de la célula.

En una modalidad, la preparación farmacéutica es un anticuerpo humano aislado o un fragmento de este. En una modalidad, la preparación farmacéutica es un bloqueador de canales iónicos que no es un anticuerpo o un análogo de este.

5 Liberación de neuropéptidos de neuronas de ratones con Nav1.7 humanizada

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

El péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), un péptido de 37 aminoácidos, se sintetiza predominantemente y se almacena en las neuronas sensoriales y puede liberarse desde los axones centrales y periféricos. (Poyner, D.R. 1992. Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol. Ther.* 56(1): 23-51). La liberación de CGRP desde las terminales de los nervios sensoriales en los tejidos periféricos desempeña una función clave en la inflamación neurogénica, mientras que la liberación desde las terminales en el asta dorsal de la médula espinal modula la transmisión del dolor. (Oku, R., M. Satoh, N. Fujii, A. Otaka, H. Yajima, y H. Takagi. 1987. El péptido relacionado con el gen de calcitonina promueve la nocicepción mecánica al potenciar la liberación de la sustancia P del asta dorsal espinal en las ratas. *Brain Res.* 403(2): 350-354). Los ratones con desactivación génica de CGRP muestran una respuesta atenuada al dolor químico y a la inflamación (Salmon, A., M.I. Damaj, L.M. Marubio, M.P. Epping-Jordan, E. Merlo-Pich, y J.P. Changeux. 2001. Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in α CGRP-deficient mice. *Nature Neuroscience* 4(4): 357-358), que implica que CGRP participa en la regulación de la respuesta al dolor.

Una variedad de mediadores de la inflamación, como la prostaglandina E_2 , bradiquinina, y protones, u otros estimulantes tales como el pH bajo, factores neurotróficos y capsaicina desempeñan una función esencial en la inducción del dolor. Además, se sabe que los mediadores de la inflamación inducen la liberación de neuropéptidos mediante la activación de receptores de membrana específicos. Por ejemplo, los mediadores de la inflamación tales como la prostaglandina E_2 y la bradiquinina excitan y sensibilizan las neuronas de GRD lo que conduce a potenciales de acción bloqueados por la tetrodotoxina (Noda, K., Y. Ueda, K. Suzuki, y K. Yoda. 1997. Excitatory effects of algescic compounds on neuronal processes in murine dorsal root ganglion cell culture. *Brain Res.* 751 (2): 348-351; Nicol G.D. y M. Cui. 1994. Enhancement by prostaglandin E_2 of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurons. *Journal Physiol.* 480(Pt 3): 485-492; Momin A. y P.A. McNaughton. 2009. Regulation of firing frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Exp Brain Res.* 196(1): 45-52). Se demostró, además, que estos mediadores regulan la expresión de CGRP en neuronas de ganglios de las raíces dorsales (GRD) cultivadas (Supowit S.C., H. Zhao, K.A. Katki, P. Gupta, y D. J. Dipette 2011. Bradykinin and prostaglandin E_1 regulate calcitonin gene-related peptide expression in cultured rat sensory neurons. *Regul Pept.* 167(1): 105-111; Averbeck, B., I. Izydorczyk, y M. Kress. 2000. Inflammatory mediators release calcitonin gene-related peptide from dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neuroscience* 98(1): 135-140). Más aún, la prostaglandina E_2 potencia la liberación de CGRP estimulada por bradiquinina y capsaicina (Vasko M.R., W. B. Campbell, y K. J. Waite. 1994. Prostaglandin E_2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 14(8): 4987-4997; Southhall, M.D. y M. R. Vasko. 2001. Prostaglandin receptor subtypes EP3C and EP4 mediate the prostaglandin E_2 -induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 276: 16083-16091). La liberación de CGRP de los nervios estimulados se bloquea por el antagonista del canal de sodio tetrodotoxina (TTX) y por la conotoxina omega (CTX) pero no por la nifedipina, un bloqueador de canales de calcio conocido. (Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, K. Alving, P. Delay-Goyet, y Y. Lou. 1992. Release of Calcitonin Gene-Related Peptide from Sensory Neurons. *Ann NY Acad. Sci.* 657:187-93). Estos últimos hallazgos sugieren que si bien los canales de calcio de tipo N son importantes para la exocitosis del péptido desde los depósitos ubicados en las vesículas con núcleo denso grandes de los aferentes primarios, los canales de sodio también desempeñan una función en la liberación de CGRP. Se demostraron características similares para la liberación de péptido evocada por bajas concentraciones de capsaicina, que también es sensible tanto a TTX como a CTX. Sin embargo, la alta concentración de capsaicina causa una liberación masiva de CGRP que solo se inhibe marginalmente, en todo caso, por TTX o CTX. (Lou Y.P., A. Franco-Cereceda, y J. M. Lundberg. 1992. Different ion channel mechanisms between low concentrations of capsaicin and high concentrations of capsaicin and nicotine regarding peptide release from pulmonary afferents. *Acta Physiol. Scand.* 146(1): 119-127). Estos informes sugieren que la liberación de CGRP inducida por diferentes agentes inflamatorios depende de diferentes canales/receptores y/o vías. Así, la estimulación correcta para la interacción de receptores diana específicos conocidos por su asociación con las respuestas al dolor puede identificarse a través de la medición de la liberación de CGRP desde las neuronas. Esto permite el análisis funcional específico de un receptor diana y el descubrimiento de cómo funciona el receptor diana en las respuestas al dolor.

La despolarización de neuronas conduce a un aumento en la expresión y liberación de neuropéptidos, en particular un aumento en la expresión de CGRP. La liberación de CGRP se usó en varios estudios para evaluar la mediación de la respuesta al dolor y la caracterización de la función neuronal que incluye la generación de potenciales de acción con respecto a otros canales (aunque no en canales de sodio). Como se describió anteriormente, se demostró que los mediadores de la inflamación, *por ejemplo*, bradiquinina y prostaglandina E_2 , inducen la liberación

de CGRP del ganglio de la raíz dorsal (GRD) en cultivo (Averbeck, B. et al., *supra*; Tumati, S., W. R. Roeske, T. W. Vanderah, y E. V. Varga. 2010. Sustained morphine treatment augments prostaglandin E2-evoked calcitonin gene-related peptide release from primary sensory neurons in a PKA-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 648(1-3):95-101). Aunque la liberación de CGRP *in vitro* a partir de GRP reveló una función esencial para los canales de calcio, la participación en los canales de sodio se mantuvo menos clara (Ai, X., S. E. MacPhedran, y A. K. Hall. 1998. Depolarization stimulates initial CGRP expression by embryonic sensory neurons in vitro. *J. Neurosci.* 18(22): 9294-9302; Strecker, T., K. Messlinger, M. Weyand, y P. W. Reeh. 2005. Role of different proton-sensitive channels in releasing calcitonin gene-related peptide from isolated hearts of mutant mice. *Cardiovasc. Res.* 65(2):405-410; Spitzer, M. J., P. W. Reeh, y S. K. Sauer. 2008. Mechanisms of potassium- and capsaicin-induced axonal calcitonin gene-related peptide release: involvement of L- and T-type calcium channels and TRPV1 but not sodium channels. *Neurosci.* 151(3):836-842). Así, se mantiene la necesidad de desarrollar ensayos que evalúen la función neuronal mediada por canales de sodio, en particular mediante la aplicación de GRD que expresan una proteína Nav1.7 humana.

Los métodos para la medición de la liberación de neuropéptidos de neuronas aisladas de ratones que expresan Nav1.7 humana son útiles, *por ejemplo*, para dilucidar la función de las neuronas nociceptivas que expresan una proteína Nav1.7 humana en respuesta a mediadores de la inflamación mediante la medición de la liberación de CGRP. Son útiles, además, para la identificación de antagonistas específicos para Nav1.7 a través de la evaluación de su capacidad para alterar o modificar la liberación de CGRP inducida por un mediador de la inflamación en un GRD aislado de ratones que expresan una proteína Nav1.7 humana.

Las neuronas de GRD, conocidas por expresar Nav1.7, liberan CGRP después de la despolarización. Esta propiedad de las neuronas de GRD sugiere que los GRD que expresan Nav1.7 humana pueden usarse en un ensayo como un medio para identificar antagonistas de Nav1.7 mediante el uso de la medición del CGRP liberado del GRD aislado en cultivo. Así, las neuronas (por ejemplo, las neuronas de GRD) que expresan una Nav1.7 humana o una Nav1.7 quimérica pueden emplearse en un ensayo para identificar antagonistas de Nav1.7 que interactúan con los canales Nav1.7 humanos o quiméricos en las neuronas de GRD y evaluar la actividad funcional del canal a través de la medición de la liberación de CGRP. En tal ensayo, *por ejemplo*, la Nav1.7 humana o quimérica se incuba con un inhibidor de Nav1.7 (*por ejemplo*, tetrodotoxina) durante aproximadamente veinte minutos, seguido de la estimulación con uno o más mediadores de la inflamación (*por ejemplo*, prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina) durante otros veinte minutos. En este ensayo pueden emplearse antagonistas candidatos adicionales para evaluar su potencial terapéutico y su capacidad para bloquear la función del canal Nav1.7. Una vez que se determinan las mediciones basales de la liberación de CGRP de las neuronas que expresan una Nav1.7 humana o quimérica tanto en presencia de un inhibidor de Nav1.7 conocido (*por ejemplo*, TTX) como en la ausencia de un inhibidor conocido (*es decir*, con mediadores de la inflamación solamente), el aumento en la liberación de CGRP puede determinarse fácilmente cuando se emplean antagonistas candidatos en este ensayo. Así, un ensayo adaptado para la interacción con una proteína canal Nav tal como Nav1.7 es útil, *por ejemplo*, para la identificación de antagonistas específicos para Nav1.7 a través de la evaluación de su capacidad de alterar o modificar el nivel de liberación de CGRP en un GRD aislado de ratones que expresa una proteína Nav1.7 humana que se expone a mediadores de la inflamación.

En la presente descripción se describen ensayos que miden la liberación de neuropéptidos en células neuronales en respuesta a uno o más mediadores de la inflamación, que pueden usarse como pruebas funcionales para seleccionar antagonistas para un receptor diana. Específicamente, en la presente descripción se describen ensayos que miden la liberación de CGRP a partir de GRD cultivados para la evaluación de la función del canal de sodio en presencia y ausencia de antagonistas específicos, en particular los GRD expresan una proteína Nav1.7 humana, y que proporcionan nuevos métodos *in vitro* para la evaluación de la activación de nociceptores primarios. En una modalidad, las neuronas de GRD se ponen en contacto con uno o más mediadores de la inflamación (*por ejemplo*, prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina, para interactuar específicamente con canales Nav sensibles a TTX, específicamente a Nav1.7) y se determina la liberación de CGRP inducida por los mediadores de la inflamación.

Las neurotrofinas tales como GDNF, neurturina y artemina demostraron potenciar la liberación de CGRP que se induce por capsaicina (Schmutzler, B. S., S. Roy, y C. M. Hingtgen. 2009. Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands enhance capsaicin-stimulated release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. *Neurosci.* 161:148-156; Schmutzler, B. S., S. Roy, S. K. Pittman, R. M. Meadows, y C. M. Hingtgen. 2011. Ret-dependent and Ret-independent mechanisms of Gfl-induced sensitization. *Molecular Pain* 7:1-22). Las neurotrofinas se unen, preferentemente, a su propio receptor de la familia GDNF (GFRα1, GFRα2 y GFRα3), y existe una coexpresión del 90 % de GFRα3 con TRPV1, que se conoce, además, como el receptor de capsaicina. La capsaicina es un agonista de TRPV1 y casi todas las neuronas que expresan TRPV1 también expresan CGRP. La artemina sola no cambia el nivel basal de la liberación de CGRP. Sin embargo, la preincubación con artemina durante diez minutos antes de la estimulación con 1 μM de capsaicina potencia significativamente la liberación de CGRP. Así, un ensayo en el que las neuronas se incuban con artemina (*por ejemplo*, a 10 ng/ml) o GDNF (*por ejemplo*, a 10 ng/ml) durante diez minutos, seguido de la estimulación con capsaicina durante otros diez minutos, puede emplearse para interactuar específicamente con GFRα3 y evaluar la actividad funcional del receptor a través de la medición de la liberación de CGRP de las neuronas de GRD *in vitro*. Además, el ensayo puede emplear antagonistas específicos de, *por ejemplo*, GFRα3 para determinar su capacidad para bloquear la actividad y/o

función del receptor.

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

El principio del ensayo puede adaptarse para otro receptor diana, por ejemplo, ASIC1 y/o ASIC3. ASIC1 y ASIC3 son canales catiónicos activados por protones que se activan mediante variaciones de pH externas en el intervalo de pH 6.8 a 4.0. Se demostró que un pH bajo desencadena la liberación de CGRP. Así, un ensayo en el que las neuronas de GRD aisladas de un ratón como se describe en la presente descripción, se exponen a condiciones de pH bajo en cultivo podría usarse para interactuar específicamente con ASIC1 (o ASIC3) para servir como un medio para evaluar funcionalmente la actividad de ASIC1 (o ASIC3) a través de la medición de la liberación de CGRP de las neuronas de GRD *in vitro*. Además, podrían emplearse antagonistas específicos en el ensayo para determinar su capacidad de bloquear la actividad y/o función de ASIC1 (o ASIC3).

En un aspecto, se proporciona un método para medir la actividad de un receptor diana, que comprende poner en contacto un mediador de la inflamación con una célula que tiene un receptor diana codificado por un gen de ratón humanizado, en donde el mediador de la inflamación se une al receptor diana, y determinar la liberación de neuropéptidos mediada por el receptor de la célula. En una modalidad, el mediador de la inflamación es un ligando de Nav1.7, y el receptor diana es una Nav1.7 de ratón humanizada.

En un aspecto, se proporciona un método para interactuar selectivamente con un receptor diana, que comprende poner en contacto una célula aislada de un ratón como se describe en la presente descripción con uno o más mediadores de la inflamación, para de esta manera interactuar selectivamente con el receptor diana y determinar la liberación de un neuropéptido de la célula aislada.

En una modalidad, el receptor diana es un canal de sodio. En una modalidad específica, el canal de sodio es Nav1.7.

En una modalidad, la célula es una célula neuronal. En una modalidad específica, la célula neuronal es una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD). En una modalidad, la célula es una célula inmortalizada.

En una modalidad, el uno o más mediadores de la inflamación se seleccionan de prostaglandina E₂, bradiquinina, capsaicina, protones, pH bajo, un factor neurotrófico y una combinación de estos.

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

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

En una modalidad, se proporciona un método para interactuar selectivamente con una proteína Nav1.7 en la superficie de un GRD aislado de un ratón como se describe en la presente descripción, que comprende poner en contacto el GRD con uno o más mediadores de la inflamación y de esta manera estimular selectivamente a Nav1.7 y determinar la liberación de CGRP.

En una modalidad, el uno o más mediadores de la inflamación comprenden prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina.

En una modalidad, el método se emplea como un ensayo funcional para seleccionar un antagonista de Nav1.7. En una modalidad específica, el antagonista es un anticuerpo.

En un aspecto, se proporciona un método para medir la liberación de CGRP a partir de un GRD aislado de un ratón como se describe en la presente descripción, en particular para determinar el efecto de un antagonista específico para Nav en la liberación de CGRP que se asocia con la despolarización de una proteína canal Nav1.7, en particular a través de la estimulación con uno o más mediadores de la inflamación (*por ejemplo*, prostaglandina E₂, bradiquinina, serotonina, histamina y capsaicina).

En una modalidad, el GRD se inmortaliza.

En una modalidad, el antagonista específico para Nav se selecciona de una proteína, una molécula pequeña, y un ARN interferente pequeño (siARN). En una modalidad específica, el antagonista específico para Nav es una proteína.

5 En una modalidad, un GRD aislado de un ratón como se describe en la presente descripción se cultiva en presencia de una toxina específica para Nav y, después de un período de tiempo posterior, se determina la liberación de CGRP, en donde un nivel de expresión de CGRP elevado indica inhibición de la función específica de Nav en la célula de GRD. La identidad del antagonista específico para Nav se conoce antes del cultivo con el GRD y el GRD se analiza en cuanto a los niveles basales de la expresión de CGRP en presencia y ausencia de uno o más mediadores de la inflamación.

En una modalidad, la toxina específica para Nav se selecciona de tetrodotoxina (TTX), ProTx-II y lidocaína. En una modalidad específica, la toxina específica para Nav es TTX.

15 En una modalidad, un GRD aislado de un ratón como se describe en la presente descripción se cultiva en presencia de un anticuerpo específico para Nav1.7, y se determina la liberación de CGRP, en donde un nivel de expresión de CGRP elevado indica la inhibición de la función de Nav1.7 en la célula de GRD. La identidad y el perfil bioquímico (*por ejemplo*, afinidad, especificidad, etc.) del anticuerpo específico para Nav1.7 se conoce antes del cultivo con el GRD y el GRD se analiza en cuanto al nivel basal de expresión de CGRP en presencia y en ausencia del uno o más mediadores de la inflamación.

En una modalidad el anticuerpo específico para Nav1.7 es un anticuerpo humano. En una modalidad el anticuerpo específico para Nav1.7 es un anticuerpo de ratón. En una modalidad el anticuerpo específico para Nav1.7 es un anticuerpo biespecífico.

25

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

30

Ejemplo I

Eliminación de un locus de Nav1.7 endógeno

35 El vector de transformación para introducir una eliminación del gen de Nav1.7 endógeno se generó mediante el uso de la tecnología VELOCIGENE® (ver, *por ejemplo*, la patente de los EE.UU. núm. 6,586,251 y Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Frendewey, D., Gale, N.W., Economides, A.N., Auerbach, W., Poueymirou, W.T., Adams, N.C., Rojas, J., Yasenchak, J., Chernomorsky, R., Boucher, M., Elsasser, A.L., Esau, L., Zheng, J., Griffiths, J.A., Wang, X., Su, H., Xue, Y., Dominguez, M.G., Noguera, I., Torres, R., Macdonald, L.E., Stewart, A.F., DeChiara, T.M., Yancopoulos, G.D. 2003. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nature Biotech. 21(6): 652-659) para modificar el cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-454H3 (Invitrogen). El ADN de BAC RP23-454H3 se modificó para eliminar el gen de Nav1.7 endógeno que comprende la subunidad α de este gen del canal Nav que se expresa en la superficie celular (Fig. 2).

45 Brevemente, brazos de homología corriente arriba y corriente abajo se derivaron para el ADN de BAC de ratón a partir de las ubicaciones 5' del exón 6 y 3' del exón 28 del locus de Nav1.7, respectivamente. Estos brazos de homología se usaron para generar un casete que eliminó ~81 kb del locus de Nav1.7 endógeno que comprende los exones del 6 al 28. Esta región se reemplazó con un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP (Fig. 2, parte intermedia). El vector de transformación final de 5' a 3' incluía un brazo de homología de 17 kb que comprendía la secuencia genómica de ratón 5' al exón 6 del locus de Nav1.7 endógeno, un sitio loxP 5', un casete de resistencia a neomicina, un sitio loxP 3' y un brazo de homología de 29 kb que comprende la secuencia genómica de ratón 3' al exón 28 del locus de Nav1.7 endógeno. El vector de transformación se linealizó mediante la digestión con Agel y después se usó en la recombinación homóloga en células bacterianas que contienen el clon BAC RP23-454h3 de ratón para lograr una eliminación dirigida del locus de Nav1.7 endógeno (Fig. 2, parte inferior).

55

El ADN de BAC transformado (que se describió anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden una eliminación del locus de Nav1.7 endógeno. Las células ES positivas que contienen un locus de Nav1.7 endógeno eliminado se identificaron por el ensayo de PCR cuantitativa mediante el uso de sondas TAQMAN® (Lie, Y. S. y C. J. Petropoulos. 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9: 43-48). La región corriente arriba del locus eliminado se confirmó por PCR mediante el uso de los cebadores 867TUP2F (GGGACTTCTC TGGGTTTCAGT TA; SEQ ID NO: 1) y 867TUP2R (AAAGGCTCTC AATGGGAAAC AAG; SEQ ID NO: 2) y la sonda 867TUP2P (TCAATGACTT GACATAATGC ATGCACTCC; SEQ ID NO: 3), mientras que la región corriente abajo del locus eliminado se confirmó mediante el uso de los cebadores 867TDPF (ATGTCAGCCA ATCCTTCTAA AGTG; SEQ ID NO: 4) y 867TDPR (CGTTTTGCCT AAGGCGGTAC; SEQ ID NO: 5) y la sonda 867TDPP (TCCTATGAGC CCATCAACAAC CACAC; SEQ ID NO: 6). La presencia del casete de resistencia a neomicina del vector de transformación se confirmó mediante el uso de los cebadores NEOF (GGTGGAGAGG

60

65

CTATTCGGC, SEQ ID NO: 7) y NEOR (GAACACGGCG GCATCAG; SEQ ID NO: 8) y la sonda NEOP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de eliminación corriente arriba incluyó la siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de eliminación (contenido entre paréntesis a continuación) unida contiguamente a la secuencia del casete presente en el punto de eliminación: (CTAGCTGAGC TGTCACCACA CATTGCTCCT ACCACGTATT GTACAGCTAC TGCAAGAGCA CCACAGTTGG CTTTCTGTAT C) ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT (SEQ ID NO: 10). La secuencia de nucleótidos a través del punto de eliminación corriente abajo incluyó la siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia endógena de ratón corriente abajo del punto de eliminación (contenido entre paréntesis a continuación): ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT (AGCTTCGGTT TTGATACACT GTTTACAGCC TGCGAAGGTG ACTCACTCGT GTTAATAAGA CTCTTTTACG GAGGTCTATG CCAAACCTTT TTTATCAAAT ATTCTCAAAG GCAG) (SEQ ID NO: 11). Después se usaron clones positivos de células ES para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (que se describe a continuación) para generar una camada de crías que contienen una eliminación del locus de Nav1.7 endógeno.

15 Las células ES transformadas que se describieron anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (ver, *por ejemplo*, la patente de los EE.UU. núm. 7,294,754 y Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Frenthewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela, D.M. 2007. F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nature Biotech.* 25(1): 91-99). Los ratones que portan una eliminación de los exones del 6 al 28 en el locus de Nav1.7 endógeno se identificaron por genotipificación mediante el uso de un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia del casete de resistencia a neomicina y confirmó la ausencia de la secuencia de Nav1.7 endógenas.

25 Los ratones que portan una eliminación de los exones del 6 al 28 en el locus de Nav1.7 endógeno pueden cruzarse con una cepa de ratón de eliminación con Cre (ver, *por ejemplo*, la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios lox P introducido por el vector de transformación que no se elimine, *por ejemplo*, en la etapa de células ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a higromicina se mantiene en los ratones.

30 Las crías se genotipan y una cría heterocigótica para las secuencias de Nav1.7 endógenas eliminadas se selecciona para caracterizar la eliminación de la Nav1.7 endógena.

Ejemplo II

Humanización de un locus de Nav1.7 endógeno

35 Un vector de transformación para el reemplazo del locus de Nav1.7 endógeno con el locus de Nav1.7 humano (Fig. 3) se construyó mediante el uso de un proceso de dos etapas que involucra la ligación del ADN de BAC y la reparación de GAP (Zhang, Y., J. P. P. Muyrers, G. Testa, y F. A. Stewart. 2000. ADN cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 18:1314-1317; Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. P. Muyrers, y F. A. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* 20:123-128).

45 La primera etapa en la construcción del vector de transformación de reemplazo se realizó por la ligación de un fragmento de ADN del clon de ADN de BAC RP23-454H3 de ratón con un fragmento de ADN humano del clon BAC RP11-1002M1 humano (Invitrogen). Esta ligación de fragmentos de ADN de BAC de ratón y humano creó un clon BAC modificado que contiene un reemplazo de los exones del 5 al 28 del locus de Nav1.7 de ratón (aproximadamente 81 kb) con los exones del 5 al 28 del locus de Nav1.7 humano (aproximadamente 100 kb).

50 La segunda etapa en la construcción del vector de transformación de reemplazo se realizó mediante la reparación de GAP (a la que se hizo referencia anteriormente) mediante el uso del clon BAC RP23-454H3 de ratón y el clon BAC RP11-45AJ20 humano para añadir exones adicionales del locus de Nav1.7 humano al clon BAC modificado que se generó en la primera etapa. La reparación de GAP se realizó mediante el uso de estos clones BAC humano y de ratón para reemplazar los exones del 2 al 7 del locus de Nav1.7 endógeno con los exones del 2 al 7 del locus de Nav1.7 humano (~13 kb). Esta segunda etapa añadió ~13 kb de la secuencia de Nav1.7 humana a los ~100 kb de la secuencia de Nav1.7 humana para hacer el reemplazo del locus de Nav1.7 endógeno. Se añadió un casete de resistencia a higromicina flanqueado por sitios loxP al extremo 3' del fragmento de BAC de ~113 kb que contenía el locus de Nav1.7 humano (Fig. 3, parte intermedia)

60 Los brazos de homología corriente arriba y corriente abajo se derivaron del ADN de BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' del locus de Nav1.7 endógeno para la adición al casete de resistencia a higromicina con el fragmento de ADN humano para crear el vector de transformación final para el reemplazo del locus de Nav1.7 endógeno que contenía de 5' a 3' un brazo de homología 5' que contiene 70 kb de ADN de ratón 5' del locus de Nav1.7 endógeno, un fragmento de ADN de ~113 kb que contiene los exones del 2 al 28 del locus de Nav1.7 humano, un casete de resistencia a higromicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología en 3' que contiene 147 kb de ADN de

ratón 3' del locus de Nav_v1.7 endógeno. El vector de transformación se linealizó mediante la digestión con NotI y después se usó en la recombinación homóloga en células bacterianas para lograr un reemplazo dirigido del locus de Nav_v1.7 endógeno con los exones del 2 al 28 del locus de Nav_v1.7 humano (Fig. 3, parte inferior).

5 El ADN de BAC transformado (que se describió anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un reemplazo del locus de Nav_v1.7 endógeno de ratón con un fragmento genómico que comprende un locus de Nav_v1.7 humano. Las células ES positivas que contienen una eliminación del locus de Nav_v1.7 endógeno reemplazado por un fragmento genómico que comprende un locus de Nav_v1.7 humano se identificaron mediante un ensayo cuantitativo de PCR mediante el uso de sondas Taqman[®] (Lie y Petropoulos, *supra*). Las regiones corriente arriba y corriente abajo fuera del locus modificado se confirmaron mediante PCR mediante el uso de los mismos cebadores y sondas que se describen en el Ejemplo 1 (867TUP2F/867TUP2R/867TUP2P and 867TDPF/867TDPR/867TDPP). La inserción de la secuencia de Nav_v1.7 humana se confirmó por PCR mediante el uso de los cebadores 935HF (ATCAAAGGAA CCCAAAGAAG; SEQ ID NO: 12) y 935HR (GAAGGCGAGC TGTTGCCAG; SEQ ID NO: 13) y la sonda 935HP (ATGAAGAAGC CCCAAAGCCA AGCA; SEQ ID NO: 14). La presencia del casete de resistencia a higromicina del vector de transformación se confirmó con los cebadores HYGF (TGCGGCCGATCTTAGCC; SEQ ID NO: 15) y HYGR (TTGACCGATTCTTGCGG; SEQ ID NO: 16) y la sonda HYGP (ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC; SEQ ID NO: 17). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó la siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de inserción (contenido entre paréntesis a continuación) unida contiguamente a la secuencia genómica de la Nav_v1.7 humana presente en el punto de inserción: (TTAGGTAAGG ATCCGAAGGG GAAATAAAAC CTACAGGATG AGAAG) ATGGCAATGT TGCCTCCCC AGGACCTCAG AGCTTTGTCC ATTTCAAAA ACAG (SEQ ID NO: 18). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a higromicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia genómica de la Nav_v1.7 humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenido entre paréntesis a continuación): GTATGAATAA AAAAGCATTG AAATAGGGAT TCTTGCCAAC TTGCTC (TCTCGAGATA ACTTCGTATA ATGTATGCTA TACGAAGTTA T) (SEQ ID NO: 19). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a higromicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica del ratón en el extremo 3' del locus de Nav_v1.7 endógeno (contenido entre paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGTA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGAGCTAG (CAGCTTCGGT TTTGATACAC TGTTTACAGC CTGCGAAGGT G) (SEQ ID NO: 20). Después se usaron clones positivos de células ES para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE[®] (*supra*) para generar una camada de crías que contiene un reemplazo del locus de Nav_v1.7 endógeno con un locus de Nav_v1.7 humano.

35 Las células ES transformadas que se describieron anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE[®] (*supra*). Los ratones que portan un locus de Nav_v1.7 humano se identificaron por genotipificación mediante el uso de un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de un locus de Nav_v1.7 humano.

40 Los ratones que portan el locus de Nav_v1.7 humano pueden cruzarse con una cepa de ratón de eliminación con Cre (ver, *por ejemplo*, la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de resistencia a higromicina flanqueado por sitios loxP introducido por el vector de transformación que no se elimine, *por ejemplo*, en la etapa de células ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a higromicina se mantiene en los ratones.

45 Las crías se genotifican y una cría heterocigótica para un locus de Nav_v1.7 humano se selecciona para caracterizar la humanización de Nav_v1.7.

Ejemplo III

50 **Humanización del bucle extracelular de los segmentos de transmembrana del 5 al 6 en el dominio I de un locus de Nav_v1.7 endógeno**

55 Un vector de transformación para la humanización del bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I (DI/S5-S6) se construyó mediante el método de reparación de GAP (que se describió anteriormente) mediante el uso del clon BAC RP23-20C24 de ratón y el clon BAC RP11-45AJ20 humano (Fig. 4). El método de reparación de GAP se usó para reemplazar un fragmento de ADN de 13.8 kb que contiene los exones del 7 al 9 del locus de Nav_v1.7 endógeno con un fragmento de ADN de 10 kb que contiene los exones del 7 al 9 del locus de Nav_v1.7 humano. Se añadió un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP en el extremo del fragmento de ADN humano de 10 kb que contiene los exones del 7 al 9 del locus de Nav_v1.7 humano (Fig. 4, parte intermedia).

65 Los brazos de homología corriente arriba y corriente abajo se derivaron del ADN de BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' de los exones 7 y 9, respectivamente, y se añadieron al casete de resistencia a neomicina con el fragmento humano de 10 kb para crear el vector de transformación final para la humanización del bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio I del locus de Nav_v1.7 endógeno que contenía de 5'

a 3' un brazo de homología en 5' que contiene 35 kb de ADN de ratón 5' del exón 7 del locus de Nav1.7 endógeno, un fragmento de ADN de 10 kb que contiene los exones del 7 al 9 del locus de Nav1.7 humano, un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología en 3' que contiene 27 kb de ADN de ratón 3' del exón 9 del locus de Nav1.7 endógeno. El vector de transformación se linealizó por digestión con PspX y Sall y después se usó en la recombinación homóloga en células bacterianas para lograr un reemplazo dirigido de los exones del 7 al 9 en el locus de Nav1.7 endógeno con los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano (Fig. 4, parte inferior).

El ADN de BAC transformado (que se describió anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un reemplazo de los exones del 7 al 9 en el locus de Nav1.7 endógeno de ratón con un fragmento genómico que comprende los exones del 7 al 9 de un locus de Nav1.7 humano. Las células ES positivas que contienen un fragmento genómico que comprende los exones del 7 al 9 de un gen de Nav1.7 humano se identificaron por el ensayo de PCR cuantitativa mediante el uso de sondas Taqman[®] (Lie y Petropoulos, *supra*). La región corriente arriba fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó mediante PCR mediante el uso de los cebadores 869TUPF (GGACTACAAC TGTTTATGGG CAAC; SEQ ID NO: 21) y 869TUPR (TCAATTCTTC TTCACTCTCA GCAG; SEQ ID NO: 22) y la sonda 869TUPP (TCCGGAAGGA CCTTGAGCAG AATGA; SEQ ID NO: 23), mientras que la región corriente abajo fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó con los cebadores 869TDPF (CAACAGGTGA GCAGCAACAG; SEQ ID NO: 24) y 869TDPR (GCAGGAGACA CATACACCAG AC; SEQ ID NO: 25) y la sonda 869TDPP (AAACACGCAT GTCTGAAGGC AGTCGG; SEQ ID NO: 26). La presencia del casete de resistencia a neomicina del vector de transformación se confirmó mediante el uso de los mismos cebadores y de la sonda que se describen en el Ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó la siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de inserción (contenido entre paréntesis a continuación) unida contiguamente a la secuencia genómica de la Nav1.7 humana presente en el punto de inserción: (TACATTTTAA GGACTAAAA CCATCGTGGG GGCCCTGATC CAATCAGTGA AGAAGCTCTC TGACGTCATG ATCCTCACTG TGTTCTGTCT CAGTGTGTTT) GCACTAATTG GACTACAGCT GTTCATGGGA AACCTGAAGC ATAAATGTTT TCGAAATTCA CTTGAAAATA ATGAAACATT AGAAAGCATA ATGAATACCC T (SEQ ID NO: 27). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a neomicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia genómica de Nav1.7 humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenido entre paréntesis a continuación): AGGTGAGTAC CAAGAGAAAC ATGCATTGTA TTTTGAATG GCATATGTAC CTGGTGTATG TTAAGAGCCT GTATTAGGAG GTTTTTTATT TATTTGAGAA TGGAGGAAAC TCTATTA (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT) (SEQ ID NO: 28). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a neomicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón 3' del exón 9 del locus de Nav1.7 endógeno (contenido entre paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGC (TCTGCAGACA GTCTGGGACT CCCTAATGTG CATTATTTAAA ATTACAGGCA ATTTACTTGG CTGATATGAG AACAGATAGT TCTGAAGTCA TCAATAATTT TCTGCTGTGT CTGACCAGCG TT) (SEQ ID NO: 29). Después se usaron clones positivos de células ES para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE[®] (que se describe a continuación) para generar una camada de crías que contienen un reemplazo de los exones del 7 al 9 del locus de Nav1.7 endógeno con los exones correspondientes del locus de Nav1.7 humano.

Las células ES transformadas que se describieron anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE[®] (*supra*). Los ratones que portaban la humanización de los exones del 7 al 9 del locus de Nav1.7 endógeno se identificaron por genotipificación mediante el uso de un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de secuencias de Nav1.7 humanas.

Los ratones que portan la DI/S5-S6 humanizada en el locus de Nav1.7 endógeno pueden cruzarse con una cepa de ratón de eliminación con Cre (ver, *por ejemplo*, la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP introducido por el vector de transformación que no se elimine, *por ejemplo*, en la etapa de células ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a neomicina se mantiene en los ratones.

Las crías se genotifican y una cría heterocigótica para la DI/S5-S6 humanizada en el locus de Nav1.7 endógeno se selecciona para caracterizar la humanización de Nav1.7 DI/S5-S6.

Ejemplo IV

Humanización del bucle extracelular de los segmentos de transmembrana del 5 al 6 en el dominio III de un locus de Nav1.7 endógeno

Un vector de transformación para la humanización del bucle extracelular del poro que conecta los segmentos de transmembrana 5 y 6 del dominio III (DIII/S5-S6) se construyó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el uso del clon BAC BMQ-311E20 de ratón y el clon BAC RP11-746P5 humano (Fig. 5). Los exones del 23 al 25 del locus de Nav1.7 humano se amplificaron a partir del clon BAC RP11-746P5 humano. Un casete de

resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP se ligó al extremo 3' del fragmento de PCR de 2.8 kb (Fig. 5, parte intermedia). Este fragmento de ADN ligado que contiene los exones del 23 al 25 del locus de Nav_v1.7 humano y el casete de resistencia a neomicina se usó para reemplazar una sección de 2.4 kb del locus de Nav_v1.7 endógeno de

5 Los brazos de homología corriente arriba y corriente abajo se derivaron del ADN de BAC de ratón en las posiciones 5' y 3' de los exones 23 y 25, respectivamente, y se añadieron al casete de resistencia a neomicina con el fragmento de ADN humano para crear el vector de transformación final para la humanización de DIII/S5-S6 del locus de Nav_v1.7 endógeno que contenía de 5' a 3' un brazo de homología en 5' que contiene 21 kb de ADN de ratón 5' del exón 23 del locus de Nav_v1.7 endógeno, un fragmento de ADN de 2.8 kb que contiene los exones del 23 al 25 del locus de Nav_v1.7 humano, un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP, y un brazo de homología en 3' que contiene 108 kb de ADN de ratón 3' del exón 25 del locus de Nav_v1.7 endógeno. El vector de transformación se linealizó por digestión con NotI y después se usó en la recombinación homóloga en células bacterianas para lograr un reemplazo dirigido de los exones del 23 al 25 en el locus de Nav_v1.7 endógeno con los exones del 23 al 25 del locus de Nav_v1.7 humano (Fig. 5, parte inferior).

El ADN de BAC transformado (que se describió anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un reemplazo de los exones del 23 al 25 en el locus de Nav_v1.7 endógeno de ratón con un fragmento genómico que comprende los exones del 23 al 25 de un locus de Nav_v1.7 humano. Las células ES positivas que contienen un fragmento genómico que comprende los exones del 23 al 25 de un gen de Nav_v1.7 humano se identificaron por el ensayo de PCR cuantitativa mediante el uso de sondas TAQMAN® (Lie y Petropoulos, *supra*). La región corriente arriba fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó por PCR mediante el uso de los cebadores 892TUPF (GCTTGGGCTT GCACCTTTA; SEQ ID NO: 30) y 892TUPR (TGCGTTGACC ACTACCTGAT AC; SEQ ID NO: 31) y la sonda 892TUPP (TCTGCATTGG CGTCTGTTT TCA; SEQ ID NO: 32), mientras que la región corriente abajo fuera de la región modificada del locus endógeno se confirmó con los cebadores 892TDP3F (TGACTTGCCC TATCAATCTG AGATC; SEQ ID NO: 33) y 892TDP3R (GCTCACACTG TATACACACA AAATCTTC; SEQ ID NO: 34) y la sonda 892TDP3P (TCACTGCCTA TGATAAAGT; SEQ ID NO: 35). La presencia del casete de resistencia a neomicina del vector de transformación se confirmó mediante el uso de los mismos cebadores y de la sonda que se describen en el Ejemplo 1. La inserción de los exones del 23 al 25 del gen de Nav_v1.7 humano se confirmó por PCR mediante el uso de los cebadores 892HF (CACGGTTTCC TGCAAGTCAA; SEQ ID NO: 36) y 892HR (GGGACACTTA CAACTTGAAG CA; SEQ ID NO: 37) y la sonda 892HP (TCGTTCCGAA TGTTTTGCC TTATGA; SEQ ID NO: 38). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó la siguiente, que indica la secuencia genómica de ratón corriente arriba del exón 23 del locus de Nav_v1.7 endógeno (contenido entre paréntesis a continuación) unida contiguamente a la secuencia genómica de Nav_v1.7 humana presente en el punto de inserción: (TTTCATTTAT TTGAAGTGCA ATATCATCTT GGCCATCTAC TCCTCTGTAT GCTAGTAG) GTAAGCCTGG TGATCACAGA (SEQ ID NO: 39). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a neomicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia genómica de Nav_v1.7 humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenido entre paréntesis a continuación): GACTAGTATA CAATTACAAA TATGC (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT) (SEQ ID NO: 40). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a neomicina incluyó la siguiente, que indica la secuencia del casete contigua a la secuencia genómica de ratón 3' del exón 25 del locus de Nav_v1.7 endógeno (contenido entre paréntesis a continuación): TATACGAAGT TATGCTAGC (TTTCCTGCTA ACCATCATTC TGGGGTATGT GTTATGATGG AAGTTAAGTG ACAGTTACTT ATAATATGGC TGCT) (SEQ ID NO: 41). Después se usaron clones positivos de células ES para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (que se describe a continuación) para generar una camada de crías que contienen un reemplazo de los exones del 23 al 25 del locus de Nav_v1.7 endógeno con los exones correspondientes del locus de Nav_v1.7 humano.

50 Los ratones que contienen una humanización de los exones del 23 al 25 en el locus de Nav_v1.7 endógeno con el vector de transformación de Nav_v1.7-DIII/S5-S6 humana se generaron por electroporación de un ADN de BAC transformado (que se describió anteriormente) en células ES de ratón. Los clones positivos de células ES se confirmaron mediante tamizaje con Taqman™ y cariotipaje. Después se usaron clones positivos de células ES para implantar en ratones hembras mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (que se describe a continuación) para generar una camada de crías que contienen una humanización de los exones del 23 al 25 en el locus de Nav_v1.7 endógeno.

Las células ES transformadas que se describieron anteriormente se usaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 7,294,754 y Poueymirou et al., *supra*). Los ratones que portan la humanización de los exones del 23 al 25 del locus de Nav_v1.7 endógeno se identificaron por genotipificación mediante el uso de un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detectó la presencia de las secuencias de Nav_v1.7 humanas.

65 Los ratones que portan la DIII/S5-S6 humanizada en el locus de Nav_v1.7 endógeno pueden cruzarse con una cepa de ratón de eliminación con Cre (ver, *por ejemplo*, la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2009/114400) para eliminar cualquier casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP introducido por el

vector de transformación que no se elimine, *por ejemplo*, en la etapa de células ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de resistencia a neomicina se mantiene en los ratones.

Las crías se genotipan y una cría heterocigótica para la DIII/S5-S6 humanizada en el locus de Nav1.7 endógeno se selecciona para caracterizar la humanización de Nav1.7 DIII/S5-S6.

Ejemplo V

Fenotipaje del comportamiento de los ratones con Nav1.7 humanizada

Los métodos actuales para estudiar los efectos de la manipulación farmacológica de la Nav1.7 humana se basan en células transfectadas que se cultivan *in vitro*. Estas células que se modifican para expresar la proteína Nav1.7 humana carecen de proteínas auxiliares y pueden no ser completamente representativas de los mecanismos por los cuales la Nav1.7 funciona *in vivo*. Así, se generaron ratones modificados para expresar la Nav1.7 humana o Nav1.7 quimérica que tienen un bucle extracelular del poro humanizado como se describe en los Ejemplos 2 - 4 y se analizaron para comprender la función de Nav1.7 *in vivo*.

Brevemente, dos grupos (n=6/6 cada uno; machos/hembras con 10-20 semanas) de ratones, tipo silvestre (*Scn9a*^{+/+}) y ratones heterocigóticos para el reemplazo de un gen de Nav1.7 de ratón con un gen de Nav1.7 humano (*Scn9a*^{hum/+}), se sometieron cada uno a una variedad de estímulos nocifensivos (térmico con placa caliente, golpe térmico de la cola y presión mecánica nociva). Los resultados se muestran en las Fig. 6A - 6C.

En un experimento similar, dos grupos (n=10 cada uno; hembras con 10-20 semanas) de ratones, tipo silvestre (*Scn9a*^{+/+}) y ratones homocigóticos para un gen de Nav1.7 quimérico que contiene una secuencia humana que codifica un bucle extracelular del poro (DI/S5-S6; *Scn9a*^{3.1/3.1}), cada uno de ellos se sometió a una variedad de estímulos nocifensivos (térmico con placa caliente, golpe térmico de la cola, mecánico nocivo, e hipernocicepción inflamatoria mediante el uso del adyuvante completo de Freund). Los resultados se muestran en las Fig. 7A - 7D.

No se observó diferencia significativa en ninguno de los criterios de valoración agudos entre los ratones *Scn9a*^{+/+} y *Scn9a*^{hum/+} o *Scn9a*^{+/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Estos resultados demuestran que los ratones humanizados que contienen un gen de Nav1.7 humano de longitud completa en lugar del gen endógeno (como se describe en el Ejemplo 2) o una secuencia humana que codifica un bucle extracelular del poro (como se describe en el Ejemplo 3) muestran comportamientos nociceptivos normales en respuesta a estímulos nocifensivos en comparación con ratones de control de tipo silvestre.

Como se muestra en este ejemplo, los ratones modificados para expresar la proteína Nav1.7 completamente o parcialmente humana en la superficie de las neuronas responden a los estímulos nociceptivos de una manera similar en comparación con el tipo silvestre y así proporcionan una plataforma para identificar antagonistas de la subunidad α de Nav1.7 y/o un bucle extracelular del poro particular. Tales antagonistas pueden ser útiles para bloquear funciones específicas y actividades neuronales asociadas en el tratamiento de varios síndromes de dolor clínicos.

Ejemplo VI

Identificación y función de GRD en ratones con Nav1.7 humanizadas

Se generaron anticuerpos específicos para la Nav1.7 humana y se analizaron en cuanto a la unión a las células neuronales aisladas de ratones con Nav1.7 humanizada que se describen en los ejemplos 2 - 4.

Brevemente, a ratones VELOCIMMUNE[®] (patente de los EE.UU. núm. 6,596,541) se les administró el antígeno Nav1.7 (hNav1.7) humana con adyuvante (*por ejemplo* adyuvante completo o incompleto de Freund, sistema adyuvante MPL+TDM (Sigma), o RIBI (muramil dipéptidos) (ver O'Hagan 2000 Vaccine Adjuvant, por Human Press, Totowa, NJ)). Se monitoreó la respuesta inmunitaria y se aislaron anticuerpos que contienen regiones variables humanas y regiones constantes de ratón a partir de líneas celulares de hibridoma generadas a partir de células B que expresan anticuerpos recolectadas a partir de ratones inmunizados. Alternativamente, las células de hibridoma específicas de antígeno pueden aislarse por citometría de flujo. Los anticuerpos específicos para hNav1.7 pueden identificarse, además, a través del aislamiento directo de esplenocitos (*por ejemplo*, ver la patente de los EE.UU. núm. 7,582,298). Numerosos anticuerpos anti-hNav1.7 se obtuvieron por los métodos anteriores y células HEK293 modificadas para expresar de manera estable la Nav1.7 humana o la Nav1.7 humana se usaron para identificar los anticuerpos que se unen específicamente a la Nav1.7 pero no a Nav1.7 según se determinó por citometría de flujo.

Los anticuerpos anti-hNav1.7 seleccionados se probaron para determinar su capacidad para bloquear la función electrofisiológica (*por ejemplo* corriente, flujo de iones, etc.) del canal Nav1.7 mediante el uso del sistema IONWORKS QUATTRO[™] (IWQ, Molecular Devices), el sistema Port-a-Patch[®] (Nanion Technologies) y el sistema QPatch (Sophion Bioscience). La Tabla 1 expone el porcentaje de inhibición promedio para cinco anticuerpos anti-hNav1.7 seleccionados: menos del 15 % (-), 15-30 % (+), mayor que 30 % (++) . nd: no determinado.

Tabla 1

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

Inmunohistoquímica. El procesamiento del dolor es el resultado de interacciones complejas entre varias proteínas, receptores y canales que se expresan en las neuronas nociceptivas de los ganglios de las raíces dorsales (GRD). Se evaluaron los anticuerpos anti-hNav1.7 seleccionados en cuanto a la unión a las neuronas de GRD recolectadas a partir de ratones modificados para expresar Nav1.7 humana (*Scn9a^{hum/+}*, Ejemplo 2), ratones modificados para expresar una Nav1.7 quimérica que contiene un bucle extracelular del poro humano (*Scn9a^{3.1/3.1}*, Ejemplo 3) y ratones tipo silvestre (*Scn9a^{+/+}*).

Brevemente, GRD lumbares recolectados de ratones *Scn9a^{hum/+}*, *Scn9a^{3.1/3.1}* y *Scn9a^{+/+}* y ratas *Scn9a^{+/+}* (*rScn9a^{+/+}*) se disociaron y sembraron a una densidad de 5.5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos tratadas con poli-DL-oronitina (0.1 mg/ml) y laminina (5 µg/ml) seguido de incubación a 37 °C en aire al 96.5 % y CO₂ al 3.5 %. Las neuronas se mantuvieron en cultivo durante de 3 a 8 días en DMEM complementado con 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, vitaminas MEM y 10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor. Las células que se sembraron se fijaron después en PFA al 4 % y sacarosa al 4 % en PBS pH 7.2 durante 30 minutos. Después, las células se lavaron en PBS seguido del bloqueo en suero de cabra normal al 20 % durante una hora a temperatura ambiente. Después, las neuronas se permeabilizaron en suero de cabra normal al 10 % con Tritón X-100 al 0.1 % antes de la inmunotinción para confirmar la actividad de unión a la Nav1.7 humana o quimérica (o ratón y/o rata) en la superficie celular de las neuronas de GRD. La Tabla 2 expone la unión específica de la especie (+) o ninguna unión (-) a las neuronas de GRD para los anticuerpos anti-Nav1.7 seleccionados.

Tabla 2

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

Los anticuerpos anti-hNav1.7 seleccionados demostraron su unión a las neuronas de GRD que expresan una proteína Nav1.7 humana (por ejemplo, Ab3, Ab4, y Ab5), una proteína Nav1.7 quimérica (por ejemplo, Ab4) o una proteína Nav1.7 de ratón (por ejemplo, Ab2) en la superficie celular, mientras que no se observó unión a las neuronas de GRD que expresan una proteína Nav1.7 de ratón o rata para otros anticuerpos (por ejemplo, Ab1 y Ab5). Otros anticuerpos anti-hNav1.7 demostraron reactividad cruzada entre las especies dado que los anticuerpos mostraron unión a las neuronas de GRD de ratones con Nav1.7 humanizada, ratones y ratas de tipo silvestre (por ejemplo, Ab3 y Ab4).

Ensayo de liberación del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). El neuropéptido péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) se libera de los terminales periféricos y espinales de las neuronas nociceptivas de fibras peptidérgicas A y C en respuesta a los estímulos. La liberación de neuropéptidos inicia la inflamación neurogénica, la desgranulación de los mastocitos, y otras reacciones inflamatorias, lo que da como resultado hiperalgesia/sensación de dolor. Los mediadores de la inflamación tales como prostaglandina E2, bradiquinina, serotonina, histamina y capsaicina sensibilizan y estimulan directamente los GRD nociceptivos *in vitro* e *in vivo* lo que conduce de esta manera a la liberación de CGRP. Los nociceptores sensibilizados muestran un umbral de activación reducido, actividad espontánea aumentada y una respuesta aumentada a los estímulos supraumbrales. Así, puede lograrse la sensibilización de los GRD y el disparo de los potenciales de acción *in vitro* con diferentes mediadores de la inflamación lo que da como resultado la liberación de CGRP y de esta manera sirven como un medio para medir la función nociceptiva de los GRD. La activación de nociceptores primarios se determinó en cultivos de GRD *in vitro* primarios aislados de ratones con Nav1.7 humanizada y de tipo silvestre mediante la medición de la liberación de CGRP mediante el uso de un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) (Cayman, distribuido por SPLbio, Francia).

Brevemente, los GRD de entre 3 y 8 días de edad se lavaron una vez en tampón de ensayo y se mantuvieron a 37 °C hasta la adición de una mezcla inflamatoria (por ejemplo, prostaglandina E2 10 µM, bradiquinina 10 µM y capsaicina 1 µM). Dos inhibidores conocidos de los canales Nav, tetrodotoxina (TTX) y ProTx-II, se usaron para determinar si Nav1.7 desempeña una función en una liberación de CGRP inducida por la mezcla inflamatoria *in vitro*. TTX se probó a concentraciones de 1 µM, una concentración inhibitoria eficaz para canales sensibles a TTX, y 10 µM. ProTx-II inhibe en gran medida a Nav1.7 a 10 nM (Schmalhofer, W.A, Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M.G., Weinglass, A.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Koltzenburg, M., Priest, B.T. (2008) ProTx-II, a

Selective Inhibitor of Nav1.7 Sodium Channels, Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors. *Molecular Pharmacology* 74(5):1476-1484). Las neuronas se incubaron durante 20 minutos con el inhibidor (TTX o ProTx-II), seguido de la estimulación con la mezcla inflamatoria durante 20 minutos o con el inhibidor combinado con la mezcla inflamatoria durante 20 minutos. Se prepararon diluciones del compuesto en tampón de ensayo y se añadieron muestras por duplicado en una placa de EIA de CGRP humana y se incubaron durante la noche. La concentración de CGRP liberado por los GRD se midió al día siguiente mediante el uso de un ensayo ELISA. Se calcularon los promedios (media +/-desviación estándar) para cada grupo de condiciones. La Fig. 8 muestra la respuesta a la dosis para diferentes concentraciones de GRD en los ensayos de CGRP mediante el uso de TTX en las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados para TTX se muestran en la Tabla 3. Los resultados para ProTx-II se muestran en la Tabla 4. IM: mezcla inflamatoria.

En un experimento similar, la función de Nav1.7 en la liberación de CGRP potenciada por TTX en GRD recolectados a partir de ratones *Scn9a*^{3.1/3.1} se probaron mediante el uso de un anestésico local tipo aminoamida (lidocaína). Este experimento se realizó para confirmar que la potenciación de la liberación de CGRP no se debía a un efecto no específico de las toxinas en las neuronas de GRD. Los resultados se muestran en la Tabla 5. IM: mezcla inflamatoria.

En otro experimento similar, se analizaron anticuerpos anti-hNav1.7 seleccionados en cuanto a su efecto en la liberación *in vitro* de CGRP en GRD aislados de ratones *Scn9a*^{+/+}, *Scn9a*^{hum/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Los resultados se muestran en las Tablas 6 - 9. IM: mezcla inflamatoria.

Como se muestra en este Ejemplo, cuando las neuronas (GRD) que expresan una proteína Nav1.7 de tipo silvestre o quimérica en la superficie celular se preincuban con inhibidores conocidos de Nav1.7 (TTX o ProTx-II, Tabla 3 o 4, respectivamente) o un anestésico local no específico para Nav1.7 (lidocaína, Tabla 5), la liberación de CGRP inducida por la mezcla inflamatoria se potencia notablemente. Sin embargo, cuando se añadió un inhibidor de Nav1.7 o un anestésico local a la mezcla inflamatoria antes de la exposición a las neuronas, no se observó potenciación de la liberación de CGRP inducida por inflamación. Así, estos experimentos muestran que la inhibición de Nav1.7 antes de la estimulación con mediadores de la inflamación (prostaglandina E₂, bradiquinina y capsaicina) potencia la liberación de CGRP en neuronas de GRD de ratones de tipo silvestre y humanizados.

Además, cuando las neuronas (GRD) se preincuban con un anticuerpo anti-hNav1.7, la liberación de CGRP inducida por la mezcla inflamatoria se potencia notablemente (Tablas 6 - 9). Estos experimentos demuestran que las proteínas Nav1.7 humanas y quiméricas que se expresan en la superficie de los GRD en ratones humanizados son funcionales. Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-hNav1.7 fueron capaces de imitar la potenciación mediada por TTX de la liberación de CGRP inducida por mediadores de la inflamación en neuronas de GRD de ratones *Scn9a*^{hum/+} y *Scn9a*^{3.1/3.1}. Así, los ratones con Nav1.7 humanizada (*Scn9a*^{hum/+}, *Scn9a*^{3.1/3.1} y *Scn9a*^{3.3/3.3} que se describen en la presente descripción proporcionan un sistema para la caracterización *in vitro* de la unión a anticuerpos anti-hNav1.7 y de la inhibición de la función del canal *in vivo*. Además, estos ratones representan un sistema de modelo *in vivo* para el examen de nuevos antagonistas específicos para Nav1.7 y para la evaluación de su potencial terapéutico para tratar las respuestas mediadas por Nav1.7.

Tabla 3

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i> ^{+/+} expuestos a TTX	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
Tampón	3 ± 1
IM	11 ± 1
preincubación con TTX 1 µM e IM	76 ± 14
TTX 1 µM + IM	10 ± 4
IM	11 ± 4
preincubación con TTX 10 µM e IM	44 ± 7

Tabla 4

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

Tabla 5

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i> ^{3.1/3.1} expuestos a lidocaína	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
preincubación con lidocaína 5 mM e IM	40 ± 6
Lidocaína 5 mM + IM	12 ± 1

Tabla 6

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i>^{+/+} expuestos a anticuerpo anti-hNav1.7	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
IM	172 ± 17
Ab1	29 ± 4
preincubación con Ab1 e IM	168 ± 11
Ab2	35 ± 2
preincubación con Ab2 e IM	522 ± 32
Ab4	21 ± 5
preincubación con Ab4 e IM	430 ± 2
Ab5	39 ± 6
preincubación con Ab5 e IM	62 ± 2

Tabla 7

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i>^{hum/+} expuestos al anticuerpo anti-hNav1.7	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
Tampón	2 ± 1
IM	21 ± 1
preincubación con Ab1 e IM	97 ± 14
Ab1 + IM	19 ± 10
preincubación con Ab4 e IM	122 ± 35
Ab4 + IM	26 ± 1
preincubación con Ab5 e IM	82 ± 19
Ab5 + IM	20 ± 1

5

Tabla 8

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i>^{hum/+} expuestos al anticuerpo anti-hNav1.7	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
IM	30 ± 7
preincubación con Ab4 e IM	81 ± 12
preincubación con Ab5 e IM	117 ± 1

Tabla 9

CGRP liberado de GRD <i>Scn9a</i>^{3.7/3.7} expuestos al anticuerpo anti-hNav1.7	
Condiciones	CGRP (pg/ml)
IM	27 ± 3
Ab1 + IM	12 ± 2
preincubación con Ab1 e IM	38 ± 7
preincubación con Ab4 e IM	101 ± 2
preincubación con Ab5 e IM	47 ± 6

Ejemplo VII

10

Generación de líneas de células de GRD inmortalizadas de ratones humanizados

Las neuronas de GRD de ratones humanizados pueden aislarse e inmortalizarse para el estudio continuo a largo plazo de la función del canal Nav1.7 humano *in vitro*.

15

Las neuronas de GRD pueden inmortalizarse mediante cualquier método conocido en la técnica (*por ejemplo*, ver la patente de los EE.UU. núm. 2009/0298095A1). Típicamente, la inmortalización de GRD aislados se logra mediante el empleo de un vector de origen retroviral que se modifica con secuencias de ADN que codifican un oncogén. (*por ejemplo myc*) y un marcador de selección (*por ejemplo*, neomicina). Los oncogenes adecuados que pueden clonarse en un vector para inmortalizar una célula de GRD aislada incluyen factores de crecimiento o mitógenos (*por ejemplo*, c-Sis), receptores del tipo tirosina quinasa (*por ejemplo*, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), tirosina quinasas citoplásmicas (*por ejemplo*, Familia Src, familia Syk-ZAP-70 y familia BTK de tirosina quinasas), serina/treonina quinasas citoplásmicas y sus subunidades reguladoras (*por ejemplo*, sobreexpresión de Raf quinasa y quinasas dependientes de ciclina), GTPasas reguladoras (*por ejemplo*, Ras), y factores de transcripción (*por ejemplo*, myc). Una vez que el vector se construye para albergar ambas secuencias de ADN de modo que sean capaces de transcribirse dentro de la célula, este puede usarse para crear una línea de células de GRD inmortalizadas por transfección en GRD aislados de un ratón humanizado como se describe en los Ejemplos 2 - 4.

20

25

30

Brevemente, las neuronas de GRD primarias disociadas pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica (*por ejemplo*, ver Wood J.N., Bevan, S.J., Coote, P.R., Dunn, P.M., Harmar, A. Hogan, P., Latchman, D.S., Morrison, C., Rougon, G., Theveniau, M., Wheatley, S. 1990. Novel Cell lines display properties of nociceptive

sensory neurons. Proceedings of Biological Sciences, The Royal Society 241(1302):187-94; Raymond, H.K., Thode, S., Zhou, J., Friedman, G.C., Pardini, J.R., Barrere, C., Johnson, R.M., Sah, D.W.Y. 1999. Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. Journal of Neuroscience 19(13):5420-5428; Chen, W., Mi, R., Haughey, N., Oz, M., Höke, A. 2007. Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line. J of the Peripheral Nervous System 12:121-130). Los cultivos de GRD aislados que expresan una Nav1.7 humana como se describe en los Ejemplos 2 - 4, se transfectan después, por ejemplo, por electroporación, con un vector candidato modificado como se describió anteriormente.

Después de la transfección, los cultivos celulares se cultivan en medio de selección y se mantienen en el medio de selección durante hasta 1-2 semanas hasta que se forman colonias aisladas con 200-300 células. Las colonias se recolectan y expanden mediante el uso de métodos de cultivo estándar cuando alcanzan aproximadamente 80-90 % de confluencia. Las células del cultivo pueden tamizarse para detectar la expresión de la proteína Nav1.7 humana por transferencia Western o Southern mediante el uso de sondas diseñadas a partir de la secuencia de la Nav1.7 humana. Alternativamente, la confirmación de la proteína canal Nav1.7 en las células transfectadas puede lograrse mediante la reacción en cadena de la polimerasa del ADN o ARN aislado de las células transfectadas.

Una vez que la línea celular neuronal de GRD inmortalizada demuestra la capacidad de autorreplicación durante múltiples generaciones, será adecuada para varios ensayos diferentes, que incluyen, por ejemplo, el análisis de las propiedades neuronales del canal Nav1.7 humano, ensayos de toxicidad neuronal, medición de la respuesta de GRD a estímulos nociceptivos, ensayos de fijación de membranas, tamizaje de fármacos de alto rendimiento, y pruebas de bloqueadores específicos de Nav1.7 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-Nav1.7).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> ENSAYO DE LIBERACIÓN DE NEUROPEPTIDOS PARA CANALES DE SODIO
- <130> 210-002EPT1
- 30 <150> EP 12167014.5
- <151> 07-05-2012
- <150> US 13/236.117
- 35 <151> 19-09-2011
- <150> US 13/155.491
- <151> 08-06-2011
- 40 <150> US 61/485.488
- <151> 12-05-2011
- <160> 43
- 45 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- 55 <400> 1
- gggactctc tgggtcagt ta 22
- <210> 2
- <211> 23
- 60 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- 65 <400> 2

ES 2 656 852 T3

	aaaggctctc aatgggaaac aag	23
5	<210> 3 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 3 tcaatgactt gacataatgc atgcactcc	29
15	<210> 4 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 4 atgtcagcca atccttctaa agtg	24
30	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintético	
	<400> 5 cgttttgcct aaggcggtag	20
40	<210> 6 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético	
	<400> 6 tcctatgagc ccatcacaac cacac	25
50	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintético	
	<400> 7 ggtggagagg ctattcggc	19
60	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	
	<400> 8	

ES 2 656 852 T3

gaacacggcg gcatcag 17

5 <210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 9
tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

15 <210> 10
<211> 115
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 10

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

25 <210> 11
<211> 148
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 11

ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatagcttc ggttttgata cactgtttac 60
agcctgcgaa ggtgactcac tcgtgtaaat aagactcttt tacggaggtc tatgccaaac 120
tctttttatc aaatattctc aaaggcag 148

40 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 12
atcaaaggaa cccaaagaag 20

50 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintético

<400> 13
gaagggcagc tgttgccag 20

60 <210> 14

ES 2 656 852 T3

```

<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5   <220>
    <223> Sintético

    <400> 14
    atgaagaagc cccaaagcca agca           24

10  <210> 15
    <211> 17
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

15  <220>
    <223> Sintético

    <400> 15
    tgcggccgat cttagcc                 17

20  <210> 16
    <211> 18
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25  <220>
    <223> Sintético

    <400> 16
    ttgaccgatt ccttgccg                18

30  <210> 17
    <211> 21
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

35  <220>
    <223> Sintético

    <400> 17
    acgagcgggt tcggcccatt c           21

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

45  <220>
    <223> Sintético

    <400> 18

    ttaggtaagg atccgaaggg gaaataaaac ctacaggatg agaagatggc aatggtgcct 60
    cccccaggac ctcagagctt tgtccatttc acaaaaacag                          99

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

60  <220>
    <223> Sintético

    <400> 19

```

ES 2 656 852 T3

gatatgaataa aaaagcattg aaatagggat tottgccaac ttgctctctc gagataactt 60
 cgtataatgt atgctatacg aagttat 87

5 <210> 20
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 20

tatacgaagt tatgctagta actataacgg tcctaaggta gcgagctagc agcttcggtt 60
 ttgatacact gtttacagcc tgcgaagggt 90

15 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 21
 ggactacaac tgttatggg caac 24

30 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 22
 tcaattctc ttactctca gcag 24

40 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 23
 tccggaagga ccttgagcag aatga 25

50 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintético

<400> 24
 caacaggtga gcagcaacag 20

60 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN

ES 2 656 852 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 25
gcaggagaca catacaccag ac 22

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

15 <220>
<223> Sintético

<400> 26
aaacacgcat gtctgaaggc agtcgg 26

20 <210> 27
<211> 201
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

<400> 27

tacattttaa ggactaaaaa ccatcgtggg ggcctgac caatcagtga agaagctctc 60
tgaogtcatg atcctcactg tgttctgtct cagtgtgttc gcactaattg gactacagct 120
gttcatggga aacctgaagc ataaaatggtt tcgaaattca cttgaaaata atgaaacatt 180
agaaagcata atgaataccc t 201

30

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

35 <220>
<223> Sintético

40 <400> 28

aggtgagtac caagagaaac atgcattgta tttttgaatg gcatatgtac ctgggtgatg 60
ttaagagcct gtattaggag gttttttatt tatttgagaa tggaggaaac tctattactc 120
gagataactt cgtataatgt atgctatacg aagttat 157

45 <210> 29
<211> 141
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintético

<400> 29

tatacgaagt tatgctagct ctgcagacag tctgggactc cctaattgtgc attattaaaa 60
ttacaggcaa tttacttggc tgatatgaga acagatagtt ctgaagtcac caataatttt 120
ctgctgtgtc tgaccagegt t 141

ES 2 656 852 T3

5	<210> 30 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
10	<400> 30 gctgggctt gcacctta	19
	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintético	
20	<400> 31 tgcgttgacc actacctgat ac	22
	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintético	
30	<400> 32 tctgcattgg cgctgttg tca	23
	<210> 33 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintético	
40	<400> 33 tgactgccc tatcaatctg agatc	25
	<210> 34 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético	
50	<400> 34 gctcacactg tatacacaca aatcttc	28
	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintético	
60	<400> 35 tcaactgccta tgataaagt	19

ES 2 656 852 T3

<220>
<223> Sintético

5 <400> 41

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

10 <210> 42
<211> 9771
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 42

cggggctgct acctccacgg gcgcgccctg gcaggagggg cgcagctctgc ttgcaggcgg 60
tcgccagcgc tccagcggcg gctgtcggct ttccaattcc gccagctcgg ctgaggctgg 120
gctagcctgg gtgccagtgg ctgctagcgg caggcgtccc ctgagcaaca ggagcccaga 180
gaaaaagaag cagccctgag agagcgccgg ggaaggagag gcccgcgcc tctcctggag 240
ccagattctg caggtgcact ggggtgggat gatcggcggg ctaggttgca agcctcttat 300
gtgaggagct gaagaggaat taaaatatac aggatgaaaa gatggcaatg ttgcctcccc 360
caggacctca gagctttgtc catttcacaa aacagtctct tgcctcatt gaacaacgca 420
ttgctgaaag aaaatcaaag gaacccaaag aagaaaagaa agatgatgat gaagaagccc 480
caaagccaag cagtgacttg gaagctggca aacagctgcc ctctcatctat ggggacattc 540
ctcccggcat ggtgtcagag cccctggagg acttggaacc ctactatgca gacaaaaaga 600
ctttcatagt attgaacaaa gggaaaacaa tcttccgttt caatgccaca cctgctttat 660
atatgctttc tctttcagt cctctaagaa gaatatctat taagatttta gtacactcct 720
tattcagcat gctcatcatg tgcactatc tgacaaactg catatttatg accatgaata 780
accaccggga ctggacccaa aatgtcagat acacttttac tggaaatata acttttgaat 840
cacttgtaaa aatccttgca agaggctctt gtgtaggaga attcactttt ctctcgtgacc 900
cgtggaactg gctggatttt gtcgtcattg tttttgcgta tttaacagaa tttgtaaacc 960
taggcaatgt ttcagctctt cgaactttca gattattgag agctttgaaa actattttctg 1020
taatcccag cctgaagaca attgtagggg ctttgatcca gtcagtgaag aagctttctg 1080
atgtcatgat cctgactgtg ttctgtctga gtgtgtttgc actaattgga ctacagctgt 1140
tcatgggaaa cctgaagcat aatgtttttc gaaattcact tgaaaataat gaaacattag 1200
aaagcataat gaatacccta gagagtgaag aagactttag aaaaatattt tattaacttg 1260
aaggatccaa agatgctctc ctttgtgggt tcagcacaga ttcaggtcag tgtccagagg 1320
ggtacacctg tgtgaaaatt ggcagaaacc ctgattatgg ctacacgagc tttgacactt 1380
tcagctgggc cttcttagcc ttgtttagcc taatgaccca agattactgg gaaaaccttt 1440
accaacagac gctgcgtgct getggcaaaa cctacatgat cttctttgtc gtagtgattt 1500
tcttgggctc cttttatcta ataaacttga tcttggctgt ggttgccatg gcatatgaag 1560
aacagaacca ggcaaacatt gaagaagcta aacagaaaga attagaattt caacagatgt 1620
tagaccgtct taaaaagag caagaagaag ctgaggcaat tgcagcggca gcggctgaat 1680
atacaagtat taggagaagc agaattatgg gcctctcaga gagttcttct gaaacatcca 1740
aactgagctc taaaagtgtc aaagaaagaa gaaacagaag aaagaaaaag aatcaaaaaga 1800
agctctccag tggagaggaa aaggagatg ctgagaaatt gtcgaaatca gaatcagagg 1860
acagcatcag aagaaaaagt ttccaccttg gtgtcgaagg gcataggcga gcacatgaaa 1920
agaggttgtc taccoccaat cagtcaccac tcagcattcg tggctccttg ttttctgcaa 1980
ggcgaagcag cagaacaagt ctttttagtt tcaaaggcag aggaagagat ataggattctg 2040
agactgaatt tgccgatgat ggcacagca tttttggaga caatgagagc agaaggggct 2100
cactgtttgt gcccacaga ccccaggagc gacgcagcag taacatcagc caagccagta 2160
ggtccccacc aatgctgccg gtgaacggga aaatgcacag tgctgtggac tgcaacgggtg 2220
tggctctcct ggttgatgga cgetcagccc tcatgctccc caatggacag cttctgccag 2280
agggcacgac caatcaaata cacaagaaa ggcgtttagt tctctatctc ctttcagagg 2340

20

ES 2 656 852 T3

atatgctgaa t gatcccaac ct cagacaga gagcaatgag tagagcaagc atattaacaa 2400
 acactgtgga agaacttgaa gagtccagac aaaaatgtcc accttggtagg tacagatttg 2460
 cacacaaaatt cttgatctgg aattgctctc catattggat aaaattcaaa aagtgtatct 2520
 attttattgt aatggatcct tttgtagatc ttgcaattac catttgcata gttttaaaca 2580
 cattatttat ggctatggaa caccacccaa tgactgagga attcaaaaat gtacttgcta 2640
 taggaaattht ggtctttact ggaatctttg cagctgaaat ggtattaaaa ctgattgcca 2700
 tggatccata tgagtatttc caagtagget ggaatattht tgacagcctt attgtgactt 2760
 taagtttagt ggagctcttt ct agcagatg tggaggatt gtcagttctg cgatcattca 2820
 gactgctcog agtcttcaag ttggcaaaat cctggccaac attgaacatg ctgattaaga 2880
 tcattggtaa ct cagtaggg gctctaggta acctcacctt agtgttggcc atcatcgtct 2940
 tcatttttgc tgtggtcggc atgcagctct ttggtaaagag ctacaaagaa tgtgtctgca 3000
 agatcaatga tgactgtacg ctcccacggg ggcacatgaa cgactctctc cactccttcc 3060
 tgattgtgtht ccgctgtctg tgtggagagt ggatagagac catgtgggac tgtatggagg 3120
 tcgctggthca agctatgtgc cttattgtht acatgatggt catggtcatt ggaaacctgg 3180
 tggthctaaa cctattthctg gcttattat tgagctcatt tagttcagac aatcttacag 3240
 caattgaaga agacctgat gcaaaacaacc tccagattgc agtgactaga attaaaaagg 3300
 gaataaatta tgtgaaacaa accttaagtg aatthattct aaaagcattt tccaaaaagc 3360
 caaagattthc cagggagata agacaagcag aagatctgaa tactaagaag gaaaactata 3420
 thtctaacca tacactgtct gaaatgagca aaggthcaaa thtctcaag gaaaaagata 3480
 aatcagthgg thtthggaagc agcgtggaca aacactthgat ggaagacagt gatggthcaat 3540
 catttattca caatcccagc ct cagctga cagthccaat thgacctggg gaatccgatt 3600
 tggaaaaatath gaatgctgag gaactthgca thgattcogga tagthgaaac agcaaaagthg 3660
 gathaaacctg thcaagctcc thcagagthgca gthacagththg taacctthtg cctgggagaag 3720
 gagaagaagc agaggctgaa cctatgaaat cctgagagcc agaggcctgt thcagagatg 3780
 gthgtgthacg gagththctca thgctgccaag thtaacataga thcagggaaa ggaaaaatct 3840
 gthggaaacat cagggaaaacc thgctacaaga thgthgaaaca cagthgththt gaaagctthca 3900
 thgthctcat gatctgctc agcagthgthg cctgthgcttht thgagatatt tatattgaaa 3960
 ggaaaaagac cattaagatt atctctggagth atgcagacaa gatctthcact tacatctthca 4020
 thctgthgaaat gctthctaaaa thggatagcath atgththataa aacatattthc accaatgctc 4080
 gthgththggct ggattthctca thtthgthgag thtctththggth tactththgthg gcaaacactc 4140
 thggctactc agatctthggc cctathaaat cctthcggac actgagagct thaaagactc 4200
 thagagctct atctagattth gaaggaathg gthgctgththg gaatgthcactc ataggagthca 4260
 thctctgctat thgathgthgth ctactthgthg thgctatatt ctggctgata thgagctthca 4320
 thggctgthaaa thtthgthgct ggcaagththct atgagthgthg thaacaccaca gatggthgthc 4380
 gththctctgc aagthcaagth ccaaatcgtth cctgaatgththt thgcectththg aatgththgthc 4440
 aaaaatgthgctg atggaaaaac ctgaaagthg actththgataa thgthcggactth gththacctat 4500
 ctctgctthca agththgcaact ththaaagggat gthgagactth thgthgthgca gcagthggatt 4560
 ctgththaatgth agacaagcag ccaaatathg aatathgctc ctacatgthg atththththg 4620
 thgthctththt catctththggg thcattctthca cththgaaact gththcattgthg thcathcathg 4680
 athaatththca ccaacagaaa aagaagctthg gagthgcaaga catctththg acagaagaac 4740
 agaagaatha ctataatgca atgaaaaagc thgggthcctaa gaagccacaa aagcctatthc 4800
 ctcgaccagthg gaacaaaatc caagthgthg thattthgact agthgacaaat caagcctthg 4860
 athattagthg catgththct atctgthctca acatgthgthaac catgthgthgthg gaaaaggagthg 4920
 thcacaagthca acatathgact gaagthththt atthggataaa thgthgthththt athaatcttht 4980
 thcactgggaga atgthgthgthg aactgthgct cctcagacac ctactactthc actgthgthgthg 5040
 ggaathatththt thgathththgth gththgthgthg thctccattgth aggthgththt ctagctgatt 5100
 thgattgaaaac gthathththgth thccttaccct thgthctcagagth gatectgcttht gccagthgthg 5160
 gccgaatctct acgthctagthc aaaggagthca aggthgthctc cagctgctc thtthgctththg 5220
 thgthgthctct thctgctgtht ththaacatc gctctctgct cthctctgtht ctthctcatct 5280
 acgctcatcttht thggaatgthc aactththgct atgththaaaa ggaagthgthg athaatgaca 5340
 thgththcaattht thgagacttht ggcaacagthg thgaththgct gththcctaaat acaactctg 5400
 ctgthgctgggga thgaththgthg gthcactatthc ththaacagthg gthcaccctgac thgthgacccaa 5460
 aaaaagththca thctgthgagth thcagththgag gthgactgthgthg thaacctatct gththggaathg 5520
 thctactththgth tagthththct atcatatctct thctgththgth gthgthgthgthg thcattgthcag 5580
 thcatactgthg gaathththgth gththgctactg aagaaagthgthg thgaaactctg agthgagthgthg 5640
 actththgagth gththctatgag gththgggthgag agththgactc cgatgthgthgthg cagthththgthg 5700
 agththctctaa actctctgath ththgagctg cctgthgactc thctctthctc atgthgacaaac 5760
 ccaacaaagthg ccagctcatt gctcagctg thgctcagthgthg thgctcagthgthg tagthgthgthg 5820
 gthctthgacath cththththgct ththacaaagc thgthththggg thgagthgthgg gagthgthgthg 5880
 ctctthctgthc acagathgthgaa gaaagthththca thgthctgthca thctthcctaa gthgthctatg 5940

ES 2 656 852 T3

aaccatcac aaccacacta aaacggaaac aagaggatgt gtctgtact gtcattcagc 6000
 gtcttatag acgttaccgc ttaaggcaaa atgtcaaaaa tatatcaagt atatacataa 6060
 aagatggaga cagagatgat gatttactca ataaaaaaga tatggctttt gataatgta 6120
 atgagaactc aagtccagaa aaaacagatg ccacttcac caccacctct ccaccttcac 6180
 atgatagtgt aacaaagcca gacaaagaga aatatgaaca agacagaaca gaaaaggaag 6240
 acaaagggaa agacagcaag gaaagcaaaa aatagagctt cttttttgat atattgttta 6300
 cagcctgtga aagtgattta tttgtgttaa taaaactcct ttgaggaagt ctatgccaaa 6360
 atccttttta tcaaaatatt ctggaaggca gtgcagtcac taactctgat ttcctaagaa 6420
 aggtgggcag cattagcaga tggttathtt tgcactgat attctttaag aatcgtaaga 6480
 gaactctgta ggaattattg attatagcat acaaaaagtga ttcagttttt tggtttttaa 6540
 taatcagaa gacctgtag aaaactttta catctgcctt gtcacttttt cacaggattg 6600
 taattagtct tgtttcccat gtaaataaac aacacacgca tacagaaaaa tctattattt 6660
 atctattatt tggaaatcaa caaaagtatt tgccttggct ttgcaatgaa atgcttgata 6720
 gaagtaatgg acattagtta tgaatgttta gttaaaatgc attattaggg agcttgactt 6780
 ttatcaatg tacagaggtt attctatatt ttgaggtgct taaatattatt ctacattgca 6840
 tcagaaccaa tttatatgtg cctataaaat gccatgggat taaaaatata tgtaggctat 6900
 tcattttcac aaatgttttt cttctcctt gactcacat ccaacaagga taagacttac 6960
 ctttagagta ttgtgtttca tagcctttct tctttcatat ccttttttgt tcatagaata 7020
 accacagaac ttgaaaaatt attctaagta catattacac tctcaaaaaa aaacaaagat 7080
 aactgagaaa aaagtatttg acagaagttc tttttgctat tatttacata gcctaacatt 7140
 tgactgtgct gcccaaaaata ctgataatag tctcttaaac tcttttgtca aattttctctg 7200
 cttctttatg cagtattggt tagtcatcct ttcgctgtaa gcaaagttga tgaatcctt 7260
 cctgatatgc agttagtgt ttgaccacgg tacatacttg agcagataat aacttgggca 7320
 cagtatttat tgcactcact gtatacaatc ccgtgtttgg caagctttca aatcatgtaa 7380
 tatgacagac tttcacacaga tatgtgttta gtatgaataa aaaagcattg aaatagggat 7440
 tcttgccaac ttgctctctt gccaccaact tactttccta aattatggaa gtaacttttt 7500
 ttggatatac ttcaatgtat acaatgagga agatgtcacc ttctccttaa aattctatga 7560
 tgtgaaatat attttgctc aatcaacaca gtaccatggg cttctaattt atcaagcaca 7620
 tattcatttt gcattagctg tagacatcta gttttttgaa aacacctatt aatagtaatt 7680
 tgaaaagaaa taaccataat gctttttttc gtgagtttat ttcaggaata tgagatcttt 7740
 cttctataaa gttattcatg cacaggcaaa aattgagcta cacaggtaga atgtagtttt 7800
 acttagaaga tttttgtggg aggttttgaa gcaaatatat aaaacaactt tcactatttt 7860
 gctttccata tttaaaaaat aataaattac atttatataa taaatgttta aagcacatat 7920
 tttttgtgt tctggcaatt taaaaagaaa gaggatttaa acgtacctat agaaacaag 7980
 atttatgggt aaagaatgag atcagaagtc tagaatgttt ttaaattgtg atatatttta 8040
 caacatccgt tattactttg agacatttgt cctaactctac gtataaaact caatctaggg 8100
 ctaaaagatt tttataccat ctttaggttca ttcactcttag gctatttgaa ccacttttta 8160
 attaatatg aaagacacca tgcagtgttt tccgagacta catagatcat tttatcacat 8220
 acctaccaag cctgttgga ataggttttg ataatttaag tagggacctc tacaaaaat 8280
 attacaatta tcagattttt aaatacattc ttaacatcac ttaacatttg 8340
 aattcaatct accgttattt caaactcaca aatataactg cattatgaat acttacataa 8400
 tgtagtaaga caagatgttt gacaggttcg tgtgtaattt tctattaatg tttttacatt 8460
 gcctgttttt tatgtaaaat aaaaaatatg ggcaactggg ttgttaacaa cacaaattct 8520
 tcttagcatt tcaaaaatat atataaagtt gttctttttc ctatttcatg aactatgttt 8580
 ttttttaaaa taacatgggt aagttttata tatatttacg tttgtttcag gaatgtctac 8640
 ttgtgacttt ttatcaatta aaaataatat ttggaagaaa gagcttatta agtataagct 8700
 tgaagtaaaa ttagacctct ctttccatgt agattactgt ttgtactgat ggtttcacc 8760
 ttcagaaggc actgtcatat taatatttaa attttataat cgctgaactt attacacca 8820
 acaatacaga aaggcagtta cactgaagaa cttacttag aataaaatgg aagcaaacag 8880
 gttttctaaa aactttttta agtgaccagg tctcgtctctg tcaccagggc tagagtcaa 8940
 tggcatgatc atagctctct gcagcctcaa ctctgggctc aagcaaccct cctgcctcag 9000
 cctccaagt agctaagact acaggtacat gccaccatgc ctggctaata tttaaatttt 9060
 tgtagataag gggctctgct atgttgecca ggotagtctc aaactcctgg cttcaagtgt 9120
 tctactgtc atgacctgcc aacatgctgg ggtttacaggc atgagccacc atgccccaaa 9180
 caggtttgaa cacaaatctt tccgatgaaa attagagaac ctaattttag ctttttgata 9240
 gttacctagt ttgcaaaaga tttgggtgac ttgtgagctg tttttaaatg ctgattgttg 9300
 aacatcacaa cccaaaatac ttagcatgat tttatagagt tttgatagct ttattaaaaa 9360
 gagtgaaaat aaaatgcata tgtaataaaa gcagttctaa atagctattt cagagaaatg 9420
 ttaatagaag tgctgaaaga agggccaact aaattaggat ggccagggaa ttggcctggg 9480
 tttaggacct atgtatgaag gccaccaatt ttttaaaaa atctgtggtt tattatgta 9540

ES 2 656 852 T3

```
ttatcttctt gaggaaaaca atcaagaatt gcttcatgaa aataaataaa tagccatgaa 9600
tatcataaag ctgtttacat aggattcttt acaaatttca tagatctatg aatgctcaaa 9660
atgtttgagt ttgccataaa ttatattgta gttatattgt agttatactt gagactgaca 9720
cattgtaata taatctaaga ataaaagtta tacaaaataa aaaaaaaaaa a 9771
```

<210> 43

<211> 1977

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 43

ES 2 656 852 T3

Met	Ala	Met	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Val	His	Phe	Thr
1				5					10					15	
Lys	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Ile	Ala	Glu	Arg	Lys	Ser
			20					25					30		
Lys	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Ala	Pro	Lys
		35					40					45			
Pro	Ser	Ser	Asp	Leu	Glu	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gly
	50					55					60				
Asp	Ile	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Pro
65					70					75					80
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Lys	Thr	Phe	Ile	Val	Leu	Asn	Lys	Gly	Lys	Thr
				85					90					95	
Ile	Phe	Arg	Phe	Asn	Ala	Thr	Pro	Ala	Leu	Tyr	Met	Leu	Ser	Pro	Phe
			100					105						110	
Ser	Pro	Leu	Arg	Arg	Ile	Ser	Ile	Lys	Ile	Leu	Val	His	Ser	Leu	Phe
		115					120					125			
Ser	Met	Leu	Ile	Met	Cys	Thr	Ile	Leu	Thr	Asn	Cys	Ile	Phe	Met	Thr
	130					135					140				
Met	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Trp	Thr	Lys	Asn	Val	Glu	Tyr	Thr	Phe	Thr
145					150					155					160
Gly	Ile	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ser	Leu	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe
				165					170					175	
Cys	Val	Gly	Glu	Phe	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Pro	Trp	Asn	Trp	Leu	Asp
			180					185					190		
Phe	Val	Val	Ile	Val	Phe	Ala	Tyr	Leu	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	Leu	Gly
		195					200					205			
Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Arg	Thr	Phe	Arg	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Lys	Thr
	210					215					220				
Ile	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Thr	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Gln
225					230					235					240
Ser	Val	Lys	Lys	Leu	Ser	Asp	Val	Met	Ile	Leu	Thr	Val	Phe	Cys	Leu
				245				250						255	
Ser	Val	Phe	Ala	Leu	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Phe	Met	Gly	Asn	Leu	Lys
			260					265					270		
His	Lys	Cys	Phe	Arg	Asn	Ser	Leu	Glu	Asn	Asn	Glu	Thr	Leu	Glu	Ser
		275				280						285			
Ile	Met	Asn	Thr	Leu	Glu	Ser	Glu	Glu	Asp	Phe	Arg	Lys	Tyr	Phe	Tyr
	290					295					300				
Tyr	Leu	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Cys	Gly	Phe	Ser	Thr	Asp
305					310					315					320
Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Cys	Val	Lys	Ile	Gly	Arg	Asn
				325					330					335	
Pro	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Ser	Phe	Asp	Thr	Phe	Ser	Trp	Ala	Phe	Leu
			340					345					350		
Ala	Leu	Phe	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Tyr	Trp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Gln
		355					360						365		

ES 2 656 852 T3

Gln Thr Leu Arg Ala Ala Gly Lys Thr Tyr Met Ile Phe Phe Val Val
370 375 380
Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe Tyr Leu Ile Asn Leu Ile Leu Ala Val
385 390 395
Val Ala Met Ala Tyr Glu Glu Gln Asn Gln Ala Asn Ile Glu Glu Ala
405 410 415
Lys Gln Lys Glu Leu Glu Phe Gln Gln Met Leu Asp Arg Leu Lys Lys
420 425 430
Glu Gln Glu Glu Ala Glu Ala Ile Ala Ala Ala Ala Glu Tyr Thr
435 440 445
Ser Ile Arg Arg Ser Arg Ile Met Gly Leu Ser Glu Ser Ser Ser Glu
450 455 460
Thr Ser Lys Leu Ser Ser Lys Ser Ala Lys Glu Arg Arg Asn Arg Arg
465 470 475
Lys Lys Lys Asn Gln Lys Lys Leu Ser Ser Gly Glu Glu Lys Gly Asp
485 490 495
Ala Glu Lys Leu Ser Lys Ser Glu Ser Glu Asp Ser Ile Arg Arg Lys
500 505 510
Ser Phe His Leu Gly Val Glu Gly His Arg Arg Ala His Glu Lys Arg
515 520 525
Leu Ser Thr Pro Asn Gln Ser Pro Leu Ser Ile Arg Gly Ser Leu Phe
530 535 540
Ser Ala Arg Arg Ser Ser Arg Thr Ser Leu Phe Ser Phe Lys Gly Arg
545 550 555
Gly Arg Asp Ile Gly Ser Glu Thr Glu Phe Ala Asp Asp Glu His Ser
565 570 575
Ile Phe Gly Asp Asn Glu Ser Arg Arg Gly Ser Leu Phe Val Pro His
580 585 590
Arg Pro Gln Glu Arg Arg Ser Ser Asn Ile Ser Gln Ala Ser Arg Ser
595 600 605
Pro Pro Met Leu Pro Val Asn Gly Lys Met His Ser Ala Val Asp Cys
610 615 620
Asn Gly Val Val Ser Leu Val Asp Gly Arg Ser Ala Leu Met Leu Pro
625 630 635
Asn Gly Gln Leu Leu Pro Glu Gly Thr Thr Asn Gln Ile His Lys Lys
645 650 655
Arg Arg Cys Ser Ser Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Met Leu Asn Asp Pro
660 665 670
Asn Leu Arg Gln Arg Ala Met Ser Arg Ala Ser Ile Leu Thr Asn Thr
675 680 685
Val Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg Gln Lys Cys Pro Pro Trp Trp Tyr
690 695 700
Arg Phe Ala His Lys Phe Leu Ile Trp Asn Cys Ser Pro Tyr Trp Ile
705 710 715
Lys Phe Lys Lys Cys Ile Tyr Phe Ile Val Met Asp Pro Phe Val Asp
725 730 735
Leu Ala Ile Thr Ile Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Met
740 745 750
Glu His His Pro Met Thr Glu Glu Phe Lys Asn Val Leu Ala Ile Gly
755 760 765
Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Ala Ala Glu Met Val Leu Lys Leu
770 775 780
Ile Ala Met Asp Pro Tyr Glu Tyr Phe Gln Val Gly Trp Asn Ile Phe
785 790 795
Asp Ser Leu Ile Val Thr Leu Ser Leu Val Glu Leu Phe Leu Ala Asp
805 810 815
Val Glu Gly Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe
820 825 830
Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Met Leu Ile Lys Ile Ile
835 840 845

ES 2 656 852 T3

Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile
 850 855 860
 Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Ser
 865 870 875 880
 Tyr Lys Glu Cys Val Cys Lys Ile Asn Asp Asp Cys Thr Leu Pro Arg
 885 890 895
 Trp His Met Asn Asp Phe Phe His Ser Phe Leu Ile Val Phe Arg Val
 900 905 910
 Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp Asp Cys Met Glu Val Ala
 915 920 925
 Gly Gln Ala Met Cys Leu Ile Val Tyr Met Met Val Met Val Ile Gly
 930 935 940
 Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala Leu Leu Leu Ser Ser Phe
 945 950 955 960
 Ser Ser Asp Asn Leu Thr Ala Ile Glu Glu Asp Pro Asp Ala Asn Asn
 965 970 975
 Leu Gln Ile Ala Val Thr Arg Ile Lys Lys Gly Ile Asn Tyr Val Lys
 980 985 990
 Gln Thr Leu Arg Glu Phe Ile Leu Lys Ala Phe Ser Lys Lys Pro Lys
 995 1000 1005
 Ile Ser Arg Glu Ile Arg Gln Ala Glu Asp Leu Asn Thr Lys Lys Glu
 1010 1015 1020
 Asn Tyr Ile Ser Asn His Thr Leu Ala Glu Met Ser Lys Gly His Asn
 1025 1030 1035 1040
 Phe Leu Lys Glu Lys Asp Lys Ile Ser Gly Phe Gly Ser Ser Val Asp
 1045 1050 1055
 Lys His Leu Met Glu Asp Ser Asp Gly Gln Ser Phe Ile His Asn Pro
 1060 1065 1070
 Ser Leu Thr Val Thr Val Pro Ile Ala Pro Gly Glu Ser Asp Leu Glu
 1075 1080 1085
 Asn Met Asn Ala Glu Glu Leu Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Tyr Ser
 1090 1095 1100
 Lys Val Arg Leu Asn Arg Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val Asp
 1105 1110 1115 1120
 Asn Pro Leu Pro Gly Glu Gly Glu Glu Ala Glu Ala Glu Pro Met Asn
 1125 1130 1135
 Ser Asp Glu Pro Glu Ala Cys Phe Thr Asp Gly Cys Val Arg Arg Phe
 1140 1145 1150
 Ser Cys Cys Gln Val Asn Ile Glu Ser Gly Lys Gly Lys Ile Trp Trp
 1155 1160 1165
 Asn Ile Arg Lys Thr Cys Tyr Lys Ile Val Glu His Ser Trp Phe Glu
 1170 1175 1180
 Ser Phe Ile Val Leu Met Ile Leu Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ala Phe
 1185 1190 1195 1200
 Glu Asp Ile Tyr Ile Glu Arg Lys Lys Thr Ile Lys Ile Ile Leu Glu
 1205 1210 1215
 Tyr Ala Asp Lys Ile Phe Thr Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu
 1220 1225 1230
 Lys Trp Ile Ala Tyr Gly Tyr Lys Thr Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys
 1235 1240 1245
 Trp Leu Asp Phe Leu Ile Val Asp Val Ser Leu Val Thr Leu Val Ala
 1250 1255 1260
 Asn Thr Leu Gly Tyr Ser Asp Leu Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met
 1285 1290 1295
 Arg Val Val Val Asn Ala Leu Ile Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn
 1300 1305 1310
 Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly
 1315 1320 1325

ES 2 656 852 T3

Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile Asn Thr Thr Asp
 1330 1335 1340
 Gly Ser Arg Phe Pro Ala Ser Gln Val Pro Asn Arg Ser Glu Cys Phe
 1345 1350 1355 1360
 Ala Leu Met Asn Val Ser Gln Asn Val Arg Trp Lys Asn Leu Lys Val
 1365 1370 1375
 Asn Phe Asp Asn Val Gly Leu Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Val Ala
 1380 1385 1390
 Thr Phe Lys Gly Trp Thr Ile Ile Met Tyr Ala Ala Val Asp Ser Val
 1395 1400 1405
 Asn Val Asp Lys Gln Pro Lys Tyr Glu Tyr Ser Leu Tyr Met Tyr Ile
 1410 1415 1420
 Tyr Phe Val Val Phe Ile Ile Phe Gly Ser Phe Phe Thr Leu Asn Leu
 1425 1430 1435 1440
 Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu
 1445 1450 1455
 Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn
 1460 1465 1470
 Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg
 1475 1480 1485
 Pro Gly Asn Lys Ile Gln Gly Cys Ile Phe Asp Leu Val Thr Asn Gln
 1490 1495 1500
 Ala Phe Asp Ile Ser Ile Met Val Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr
 1505 1510 1515 1520
 Met Met Val Glu Lys Glu Gly Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Leu
 1525 1530 1535
 Tyr Trp Ile Asn Val Val Phe Ile Ile Leu Phe Thr Gly Glu Cys Val
 1540 1545 1550
 Leu Lys Leu Ile Ser Leu Arg His Tyr Tyr Phe Thr Val Gly Trp Asn
 1555 1560 1565
 Ile Phe Asp Phe Val Val Val Ile Ile Ser Ile Val Gly Met Phe Leu
 1570 1575 1580
 Ala Asp Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Val Ser Pro Thr Leu Phe Arg Val
 1585 1590 1595 1600
 Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Val Lys Gly Ala
 1605 1610 1615
 Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser Leu Pro Ala
 1620 1625 1630
 Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met Phe Ile Tyr Ala
 1635 1640 1645
 Ile Phe Gly Met Ser Asn Phe Ala Tyr Val Lys Lys Glu Asp Gly Ile
 1650 1655 1660
 Asn Asp Met Phe Asn Phe Glu Thr Phe Gly Asn Ser Met Ile Cys Leu
 1665 1670 1675 1680
 Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Gly Leu Leu Ala Pro Ile
 1685 1690 1695
 Leu Asn Ser Lys Pro Pro Asp Cys Asp Pro Lys Lys Val His Pro Gly
 1700 1705 1710
 Ser Ser Val Glu Gly Asp Cys Gly Asn Pro Ser Val Gly Ile Phe Tyr
 1715 1720 1725
 Phe Val Ser Tyr Ile Ile Ile Ser Phe Leu Val Val Val Asn Met Tyr
 1730 1735 1740
 Ile Ala Val Ile Leu Glu Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr
 1745 1750 1755 1760
 Glu Pro Leu Ser Glu Asp Asp Phe Glu Met Phe Tyr Glu Val Trp Glu
 1765 1770 1775
 Lys Phe Asp Pro Asp Ala Thr Gln Phe Ile Glu Phe Ser Lys Leu Ser
 1780 1785 1790
 Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu Leu Ile Ala Lys Pro Asn
 1795 1800 1805

ES 2 656 852 T3

Lys Val Gln Leu Ile Ala Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg
 1810 1815 1820
 Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly
 1825 1830 1835 1840
 Glu Ser Gly Glu Met Asp Ser Leu Arg Ser Gln Met Glu Glu Arg Phe
 1845 1850 1855
 Met Ser Ala Asn Pro Ser Lys Val Ser Tyr Glu Pro Ile Thr Thr Thr
 1860 1865 1870
 Leu Lys Arg Lys Gln Glu Asp Val Ser Ala Thr Val Ile Gln Arg Ala
 1875 1880 1885
 Tyr Arg Arg Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Val Lys Asn Ile Ser Ser Ile
 1890 1895 1900
 Tyr Ile Lys Asp Gly Asp Arg Asp Asp Asp Leu Leu Asn Lys Lys Asp
 1905 1910 1915 1920
 Met Ala Phe Asp Asn Val Asn Glu Asn Ser Ser Pro Glu Lys Thr Asp
 1925 1930 1935
 Ala Thr Ser Ser Thr Thr Ser Pro Pro Ser Tyr Asp Ser Val Thr Lys
 1940 1945 1950
 Pro Asp Lys Glu Lys Tyr Glu Gln Asp Arg Thr Glu Lys Glu Asp Lys
 1955 1960 1965
 Gly Lys Asp Ser Lys Glu Ser Lys Lys
 1970 1975

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit que comprende un antagonista de Nav1.7, una célula neuronal no humana que comprende en un locus de Nav1.7 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Nav1.7 humana o quimérica o una variante de dicha proteína con hasta 20 diferencias en la secuencia de aminoácidos, y uno o más mediadores seleccionados de prostaglandina E2, bradiquinina, capsaicina, protones, y un factor neurotrófico.
2. El kit de la reivindicación 1, en el que la célula neuronal es una célula neuronal de ratón.
- 10 3. El kit de la reivindicación 2, en el que la célula neuronal es una célula de los ganglios de las raíces dorsales (GRD).
4. El kit de la reivindicación 1, en el que la célula neuronal es de un GRD aislado de un miembro del grupo que consiste en ratón, rata o mono, en el que preferentemente el GRD se aísla de un ratón.
- 15 5. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula está inmortalizada.
6. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antagonista de Nav1.7 es un anticuerpo anti-Nav1.7.
- 20 7. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína Nav1.7 quimérica que comprende una secuencia humana del bucle extracelular del poro.
8. El kit de la reivindicación 7, en el que la secuencia humana del bucle extracelular del poro se corresponde con la secuencia del bucle extracelular del poro del dominio I o del dominio III de una proteína Nav1.7.
- 25 9. El kit de la reivindicación 1, en el que la proteína Nav1.7 es una proteína Nav1.7 quimérica codificada por el exón 1 del gen de Nav1.7 de ratón y los exones del 2 al 28 del gen de Nav1.7 humano.
- 30 10. El kit de la reivindicación 9, en el que la proteína Nav1.7 quimérica comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada de una Q10R, I136V, F216S, S241T, N395K, V400M, L823R, I848T, L858H, L858F, A863P, V872G, F1449V, o una combinación de las mismas.
- 35 11. El kit de la reivindicación 9, en el que la proteína Nav1.7 quimérica comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada de una R996C, V1298D, V1298F, V1299F, I1461T, F1462V, T1464I, M1627K, A1632E, o una combinación de las mismas.
- 40 12. El kit de la reivindicación 9, en el que la proteína Nav1.7 quimérica comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada de F1200L, I1235L, o una combinación de las mismas.

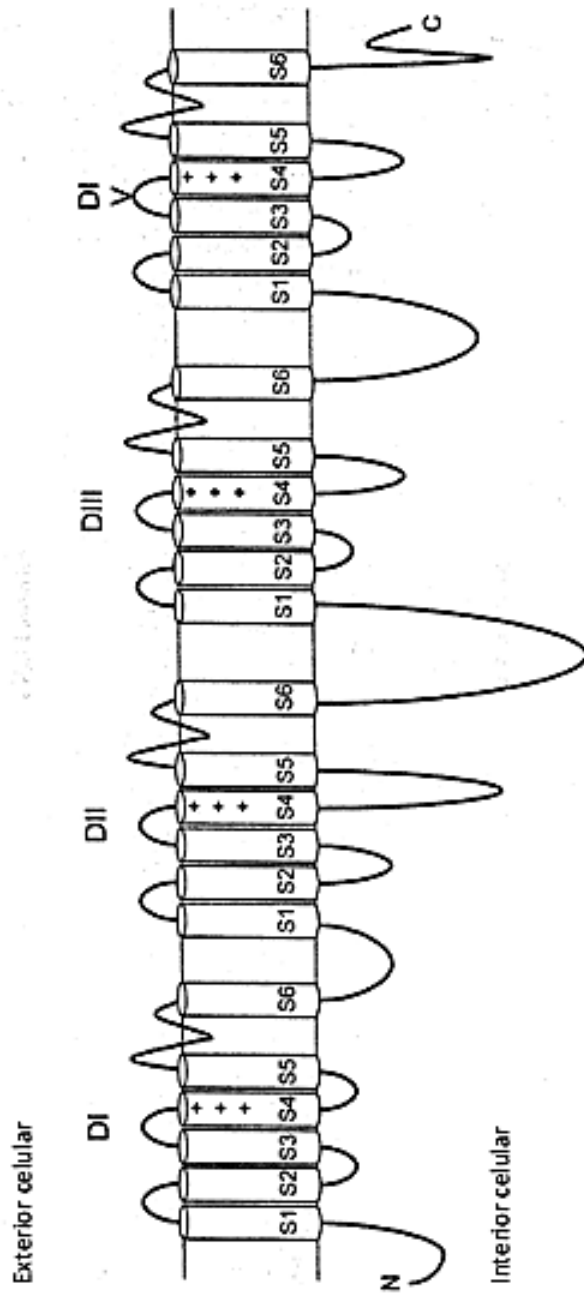


Figura 1

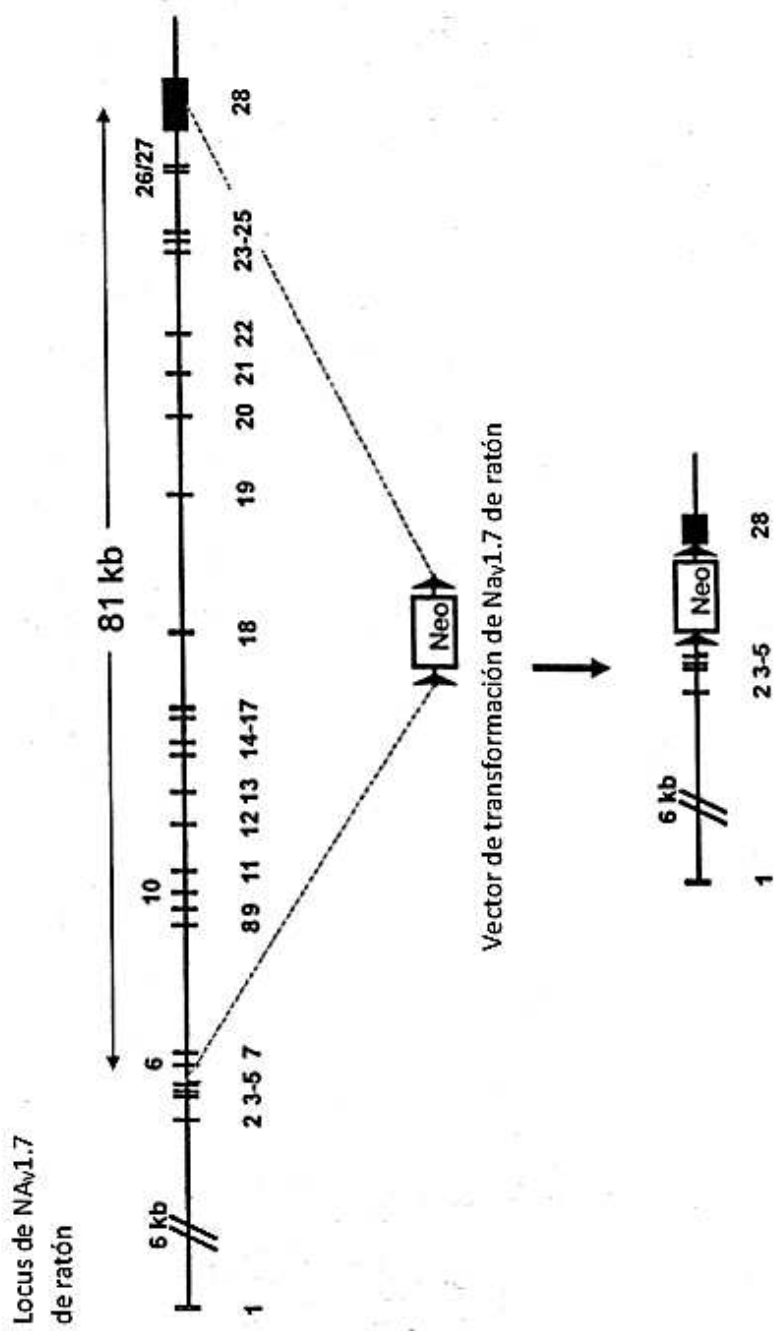


Figura 2

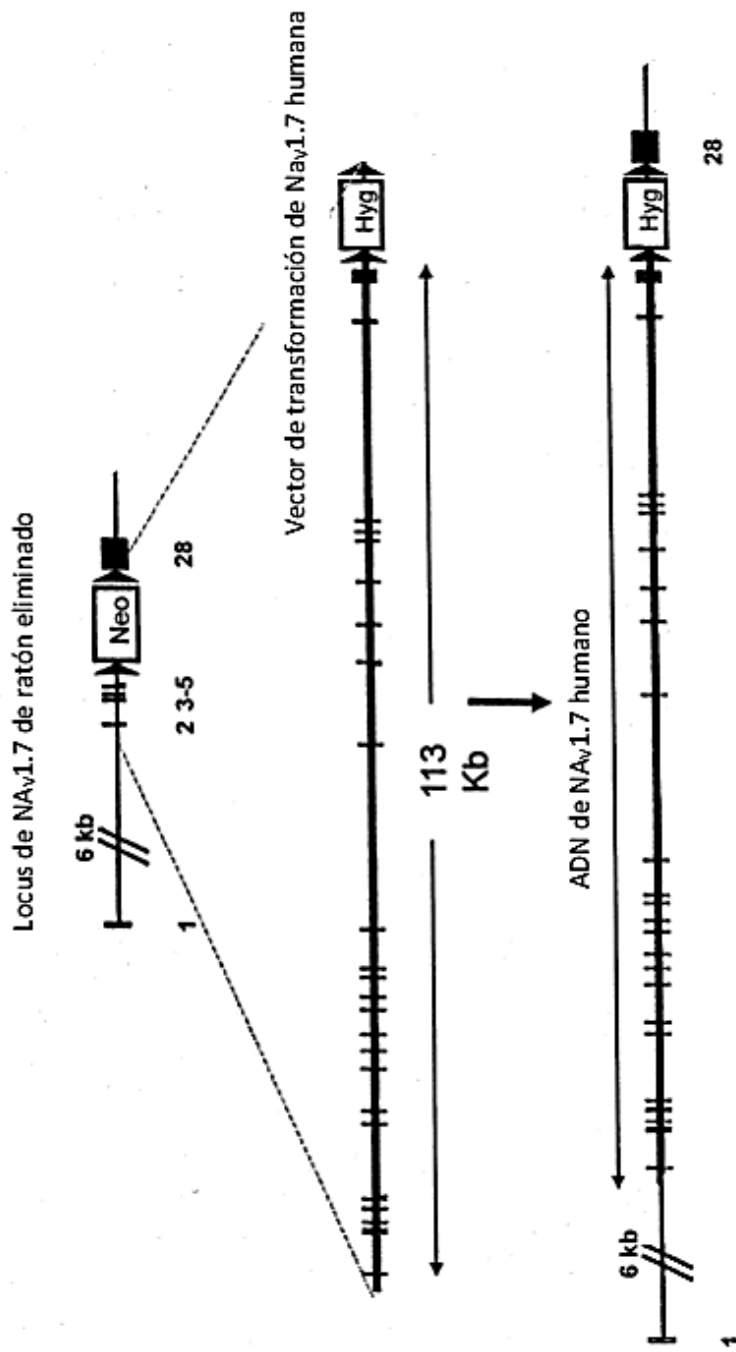


Figura 3

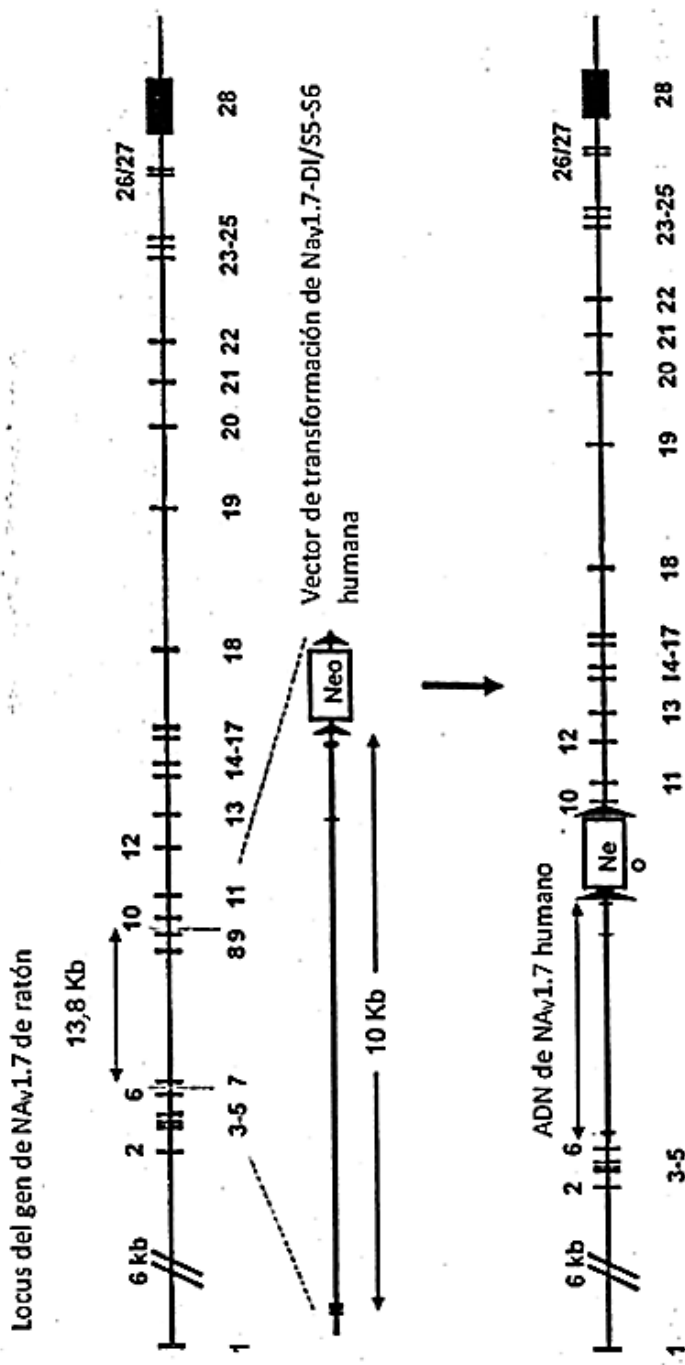


Figura 4

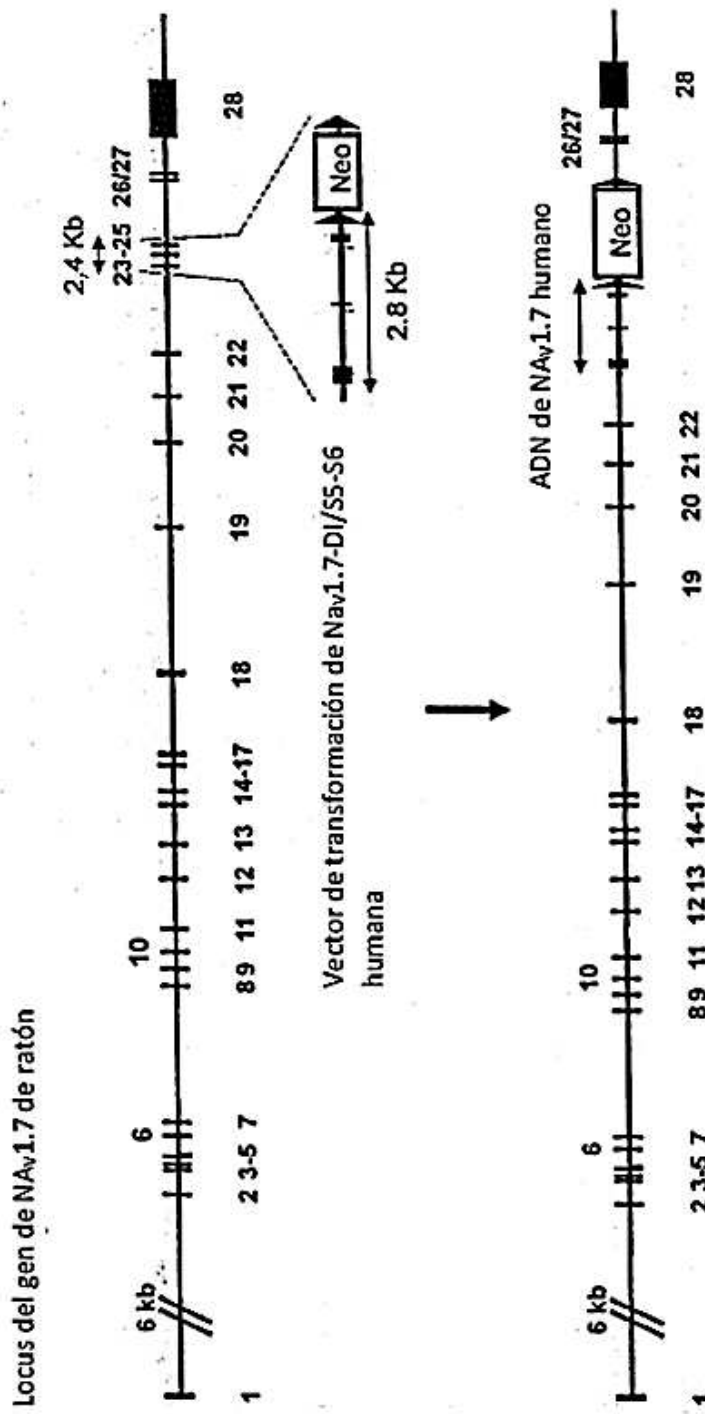


Figura 5

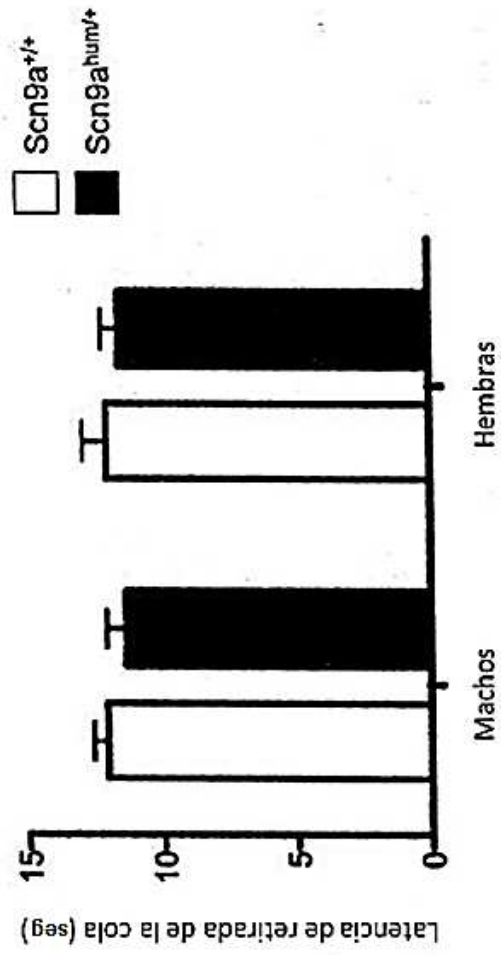


Figura 6A

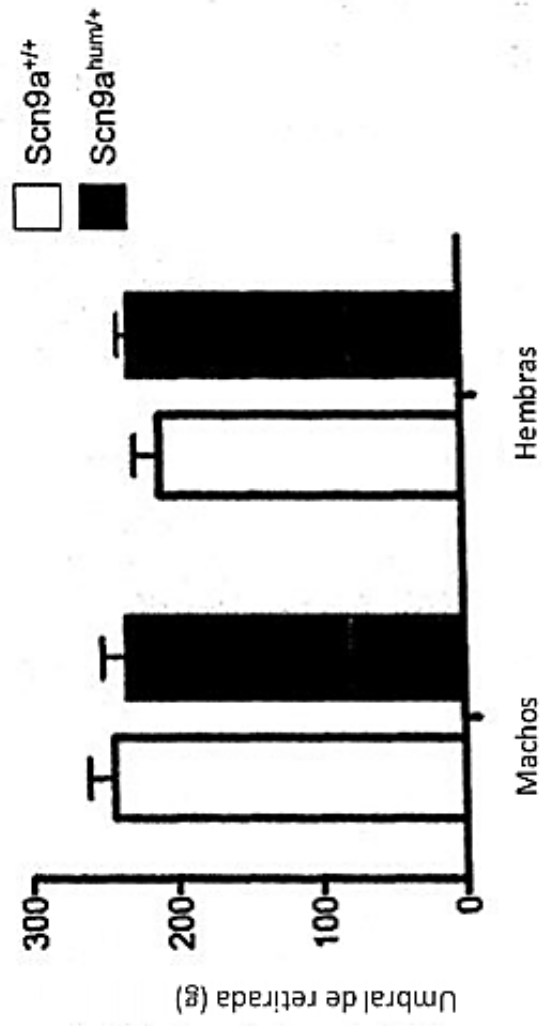


Figura 6B

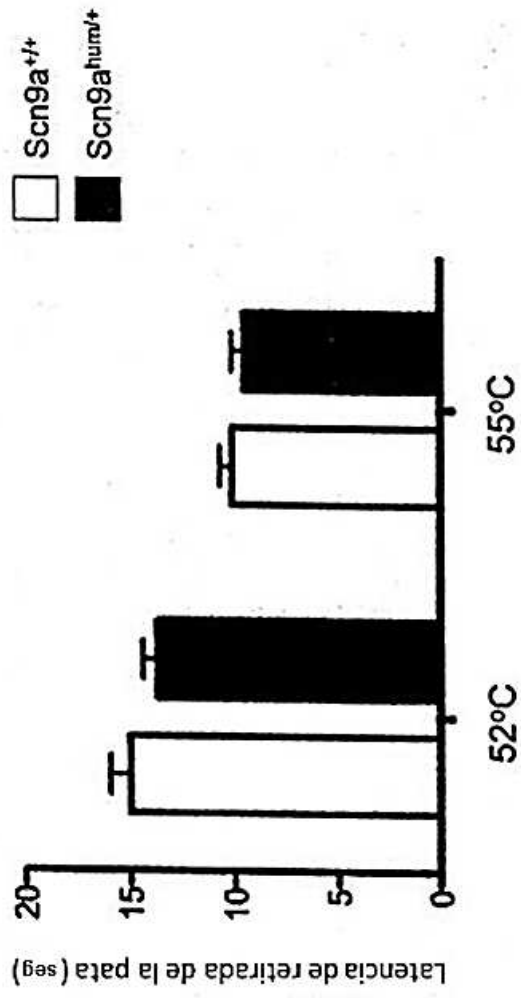


Figura 6C

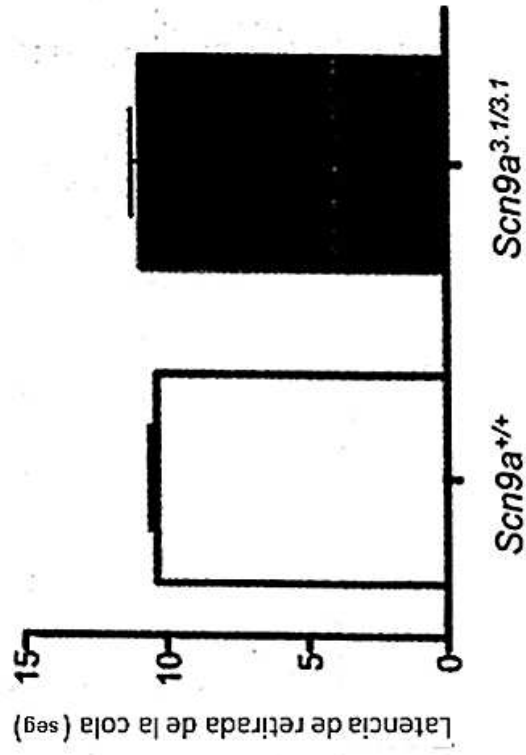


Figura 7A

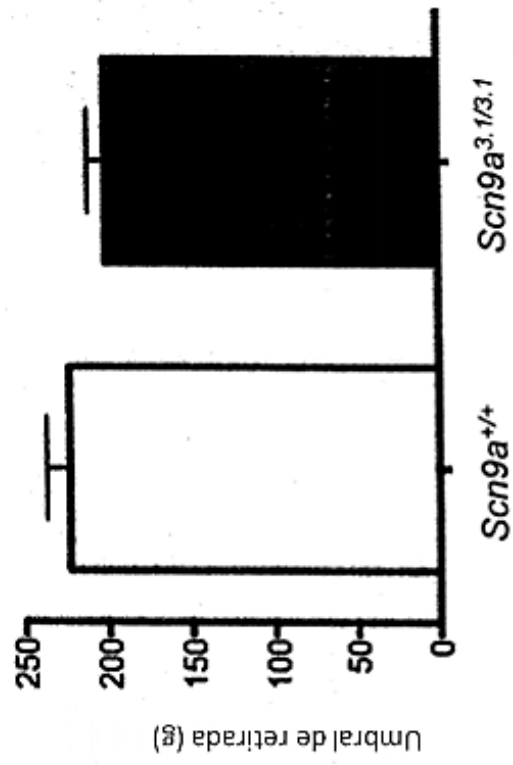


Figura 7B

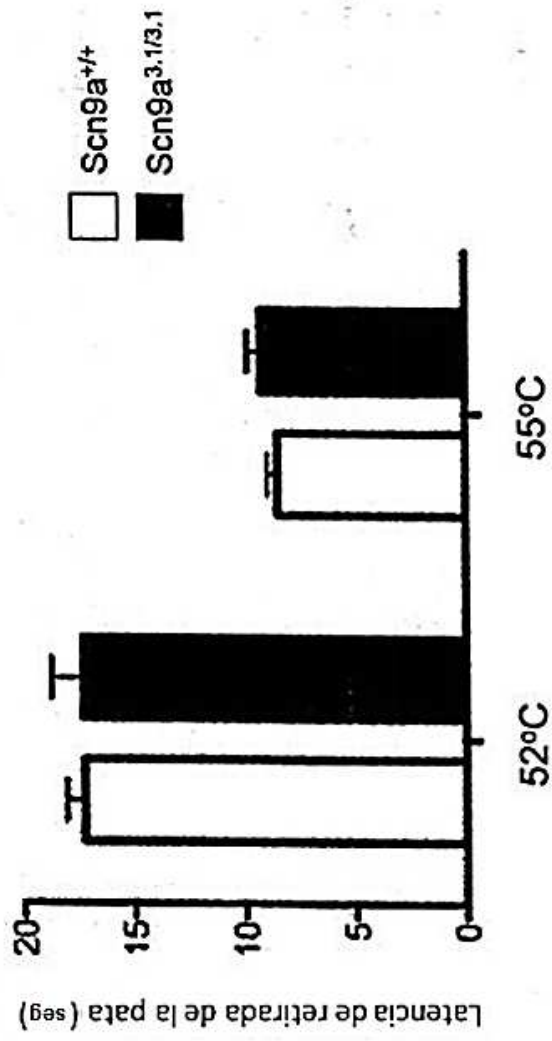


Figura 7C

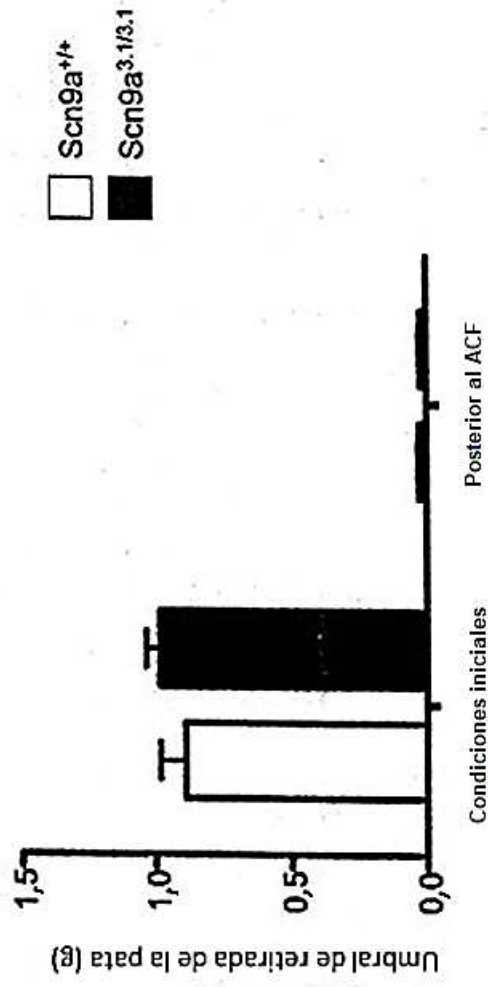


Figura 7D

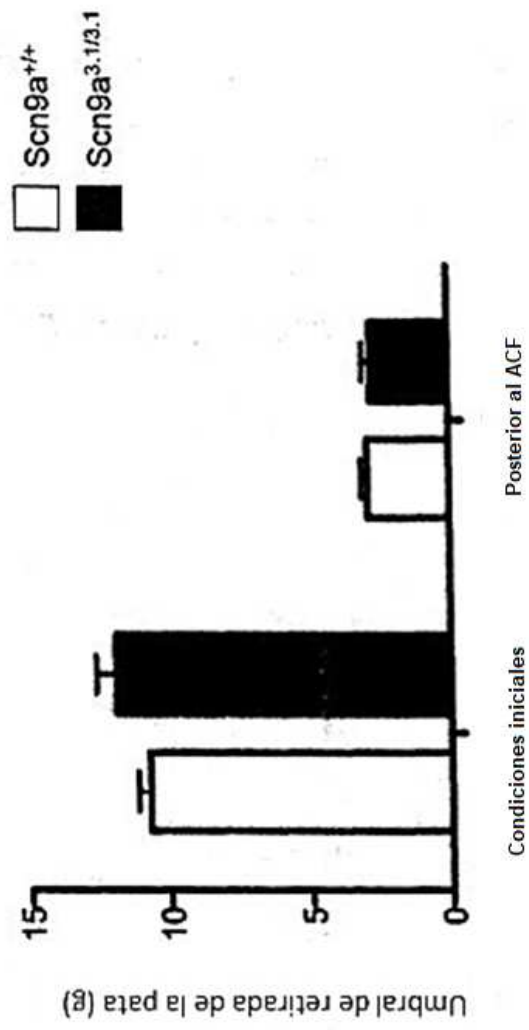


Figura 7E

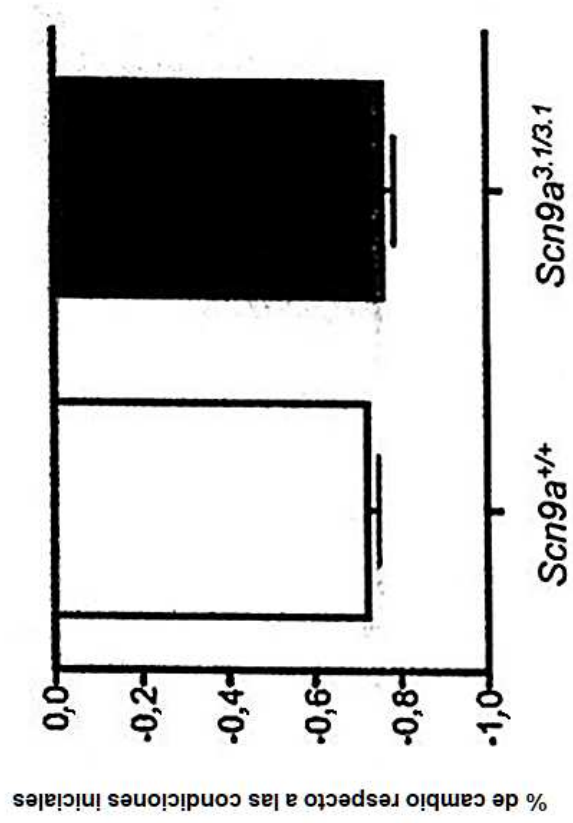


Figura 7F

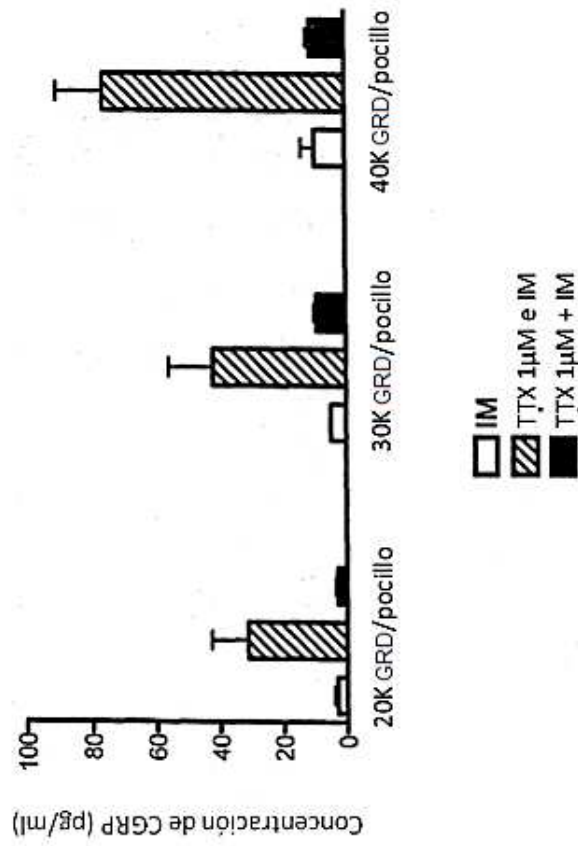


Figura 8