



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 246 715**

② Número de solicitud: 200401946

⑤ Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.08.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2006**

Fecha de la concesión: **17.04.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Torres Alemán, Ignacio;
Carro Díaz, Eva María;
Trejo Pérez, José Luis y
Spuch Calvar, Carlos**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Modelo animal de enfermedades neurodegenerativas, procedimiento de obtención y aplicaciones.**

㉒ Resumen:

Modelo animal de enfermedades neurodegenerativas, procedimiento de obtención y aplicaciones.

Se describe un animal no humano útil como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas. Este modelo animal presenta una alteración de la actividad biológica del receptor del factor trófico IGF-I localizada en las células del epitelio del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales. Dicho modelo animal puede obtenerse mediante un proceso de transgénesis. Este modelo animal es útil para el estudio de los mecanismos etiopatogénicos de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas las que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer, o para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a dichas enfermedades.

ES 2 246 715 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Modelo animal de enfermedades neurodegenerativas, procedimiento de obtención y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona, en general, con el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas; y, en particular, con el desarrollo de animales no humanos útiles como modelos de enfermedades humanas neurodegenerativas.

10 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de modelos experimentales de enfermedades neurológicas es de gran importancia para la investigación biomédica (Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3: 574-579). Para el caso de las enfermedades neurodegenerativas el desarrollo de modelos que se aproximan a las características de la enfermedad en seres humanos ha supuesto un gran avance metodológico. Sin embargo, al ser todos ellos obtenidos por manipulación genética convencional, los recursos económicos, de personal, y de instalaciones necesarios suelen ser muy elevados. Aunque a pesar de ello su uso se está generalizando, su alto coste genera una enorme carga en los recursos dedicados a la investigación.

La enfermedad de Alzheimer, un caso típico de enfermedad neurodegenerativa que cursa con demencia, es la cuarta causa de mortalidad en los países industrializados, con alrededor de 13 millones de individuos afectados, número que podría ser mayor al existir aproximadamente un 25% de casos que no se diagnostican. El pronóstico para los próximos años es un crecimiento vertiginoso de la cifra de afectados que podría superar los 40 millones en los países industrializados donde se observa un envejecimiento de la población (Dekosky *et al.* (2001) *Epidemiology and Pathophysiology of Alzheimer's disease*, *Clinical Cornestone* 3 (4): 15-26). Actualmente existen pocos medicamentos efectivos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y el coste del tratamiento de esta enfermedad por paciente es bastante caro actualmente, estimándose entorno a los 225.000 dólares US, según datos de la Asociación Americana de Alzheimer. La existencia de este grave problema de salud con un número muy limitado de medicamentos útiles ha impulsado el desarrollo de investigación encaminada a conocer el mecanismo etiopatogénico de dicha enfermedad neurodegenerativa con el objetivo de identificar y evaluar compuestos potencialmente terapéuticos frente a dicha enfermedad.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, uno de los principales avances ha venido precisamente al poderse identificar las proteínas implicadas en el Alzheimer familiar, que no está asociado con el envejecimiento como el Alzheimer esporádico, que es con mucho, la forma más frecuente de la enfermedad (Mayeux R (2003) *Epidemiology of neurodegeneration*. *Annu Rev Neurosci* 26: 81-104).

Se han desarrollado modelos transgénicos portadores de las distintas mutaciones encontradas en pacientes de Alzheimer familiar, tales como presenilinas y β amiloide (Hock BJ, Jr., Lamb BT (2001) *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. *Trends Genet* 17: S7-12). Un inconveniente muy importante es que si bien estos animales mutantes presentan varios de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, ninguno de ellos exhibe todo el espectro de cambios patológicos asociados a la misma (Richardson JA, Burns DK (2002) *Mouse models of Alzheimer's disease: a quest for plaques and tangles*. *ILAR J* 43: 89-99). En un intento de solucionar este problema se han cruzado entre sí cepas de ratones transgénicos con las distintas mutaciones que recrean cada una distintos aspectos de la enfermedad para así lograr un modelo que se asemeje mejor a la patología humana (Phinney AL, Horne P, Yang J, Janus C, Bergeron C, Westaway D (2003) *Mouse models of Alzheimer's disease: the long and filamentous road*. *Neurol Res* 25: 590-600). Por ejemplo, el cruce de ratones que expresan grandes cantidades de una de las formas mutadas de la proteína precursora de β amiloide humano (APP-Swe695) con ratones que expresan formas mutadas de presenilinas generan híbridos que presentan placas de amiloide junto con ovillos neurofibrilares y déficits cognitivos (Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) *Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1*. *Nature* 383: 710-713; Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JN, Bohrmann B, Malherbe P, Brockhaus M, Loetscher H, Czech C, Huber G, Bluethmann H, Jacobsen H, Kemp JA (2003) *PS2APP Transgenic Mice, Coexpressing hPS2mut and hAPPswe, Show Age-Related Cognitive Deficits Associated with Discrete Brain Amyloid Deposition and Inflammation*. *J Neurosci* 23: 8989-9003).

A continuación se indican, a título ilustrativo, algunas de las patentes relacionadas con modelos animales de enfermedad de Alzheimer: US20030229907, Transgenic non-human mammals with progressive neurologic disease; US20030167486, Double transgenic mice overexpressing human beta secretase and human APP-London; US20030145343, Transgenic animals expressing human p25; US20030131364, Method for producing transgenic animal models with modulated phenotype and animals produced therefrom; US20030101467, Transgenic animal model for Alzheimer disease; US20030093822, Transgenic animal model of neurodegenerative disorders; US6,717,031, Method for selecting a transgenic mouse model of Alzheimer's disease; US6,593,512, Transgenic mouse expressing human tau gene; US6,563,015, Transgenic mice over-expressing receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and mutant APP in brain and uses thereof; US6,509,515, Transgenic mice expressing mutant human APP and forming congo red staining plaques; US6,455,757, Transgenic mice expressing human APP and TGF-beta demonstrate cerebrovascular amyloid deposits; US6,452,065, Transgenic mouse expressing non-native wild-type and familial Alzheimer's Disease mutant presenilin 1 protein on native presenilin 1 null background; WO03053136, Triple transgenic model

of Alzheimer disease; WO03046172, Disease model; US6563015, Transgenic mice over-expressing receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and mutant APP in brain and uses thereof; WO0120977, Novel animal model of Alzheimer disease with amyloid plaques and mitochondrial dysfunctions; EP1285578, Transgenic animal model of Alzheimer's disease.

5

En la actualidad estos modelos animales transgénicos son los únicos aceptados para el estudio de mecanismos patogénicos de la enfermedad de Alzheimer y para el cribaje a nivel farmacéutico de nuevas drogas. Dada la disparidad de modelos que se han generado con el fin de recrear y analizar cada una de las posibles causas de la enfermedad, la disponibilidad de los mismos en muchos casos está restringida por cuestiones de derechos de propiedad y sobretodo, por la falta de los recursos materiales necesarios para generar híbridos complejos (Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular $A\beta$ and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-421). Esto significa limitaciones severas en el uso generalizado de estos modelos.

Merece la pena destacar, además, que los medicamentos existentes actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer son poco eficaces y que los modelos basados en animales transgénicos existentes presentan carencias al no reflejar perfectamente la patología de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, sigue existiendo un grave problema de salud con un muy limitado número de medicamentos útiles por lo que existe la necesidad de desarrollar modelos experimentales alternativos a los existentes que permitan estudiar el mecanismo etiopatogénico de dicha enfermedad neurodegenerativa y/o identificar y evaluar compuestos potencialmente terapéuticos frente a dicha enfermedad.

Por otro lado, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) es una proteína de membrana perteneciente a la familia de receptores con actividad enzimática tirosín-quinasa, muy similar al receptor de insulina (Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512). Sus amplias y muy relevantes funciones biológicas han hecho que sea intensamente estudiado de forma que la ruta de señalización intracelular se conoce relativamente bien (LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143-163). Su papel en patologías como cáncer, diabetes y neurodegeneración le hacen diana en la búsqueda de moduladores farmacológicos de utilidad clínica, aunque no se conoce el papel etiopatogénico, en patologías como la enfermedad de Alzheimer, que su alteración funcional puede inducir.

35 **Compendio de la invención**

La invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas humanas, tales como enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

40

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales de los plexos coroideos de los ventrículos del cerebro de un animal permite el desarrollo de un animal modelo de enfermedades neurodegenerativas, en general, y, en particular, animal modelo de enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer, que reúne las principales características de dicha enfermedad humana, que es sencillo de obtener y que se puede utilizar en animales de laboratorio con cualquier fondo genético. Para ello, y entre otras posibilidades técnicas, se inyectó mediante cirugía estereotáxica en los ventrículos laterales del cerebro un vector que contenía una forma mutada del receptor de IGF-I que elimina la actividad funcional de este factor trófico a nivel del plexo coroideo al actuar como dominante negativo (Ejemplo 1). Pocos meses después el animal presentaba todos los síntomas asociados a la enfermedad de Alzheimer: acúmulo de péptido amiloide en el cerebro, depósitos de proteína tau hiperfosforilada junto con ubiquitina, pérdida de proteínas sinápticas y déficits cognitivos severos (aprendizaje y memoria). El desarrollo de la patología tipo Alzheimer aparece de 3 a 6 meses después de la inyección del vector dependiendo del fondo genético del animal huésped, de tal forma que los animales con modificaciones genéticas que potencialmente pueden modular la aparición de la enfermedad de Alzheimer la neuropatología tipo de dicha enfermedad aparece más temprana (Ejemplos 2 y 3).

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un animal no humano útil como modelo experimental caracterizado porque presenta una alteración de la actividad biológica del receptor de IGF-I localizada en las células del epitelio del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales. Dicho animal no humano es útil como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas, en particular, enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la Enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de dicho animal no humano útil como modelo experimental que comprende la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal no humano mediante un proceso de transgénesis. Para ello, es necesario el desarrollo de construcciones génicas y vectores los cuales, junto con sus aplicaciones, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

65

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicho animal no humano como modelo experimental para el estudio del mecanismo etiopatogénico de una enfermedad neurodegenerativa o para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a dicha enfermedad. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa humana que cursa con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer.

Una de las ventajas del modelo experimental desarrollado por esta invención radica en que refleja perfectamente la patología de la enfermedad de Alzheimer, por lo que dicho modelo representa un salto cualitativo en el estudio del mecanismo etiopatogénico de dicha enfermedad neurodegenerativa así como en el desarrollo de herramientas eficaces para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a dicha enfermedad.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una foto que muestra que el vector lentiviral HIV/GFP permite la expresión del transgén en las células del plexo coroideo, observándose la expresión de proteína autofluorescente verde GFP (verde) en células del plexo coroideo (flechas) de rata adulta tras inyección intracerebroventricular (icv) del vector HIV/GFP. La foto muestra células del plexo coroideo de un animal que recibió, 3 meses antes de ser sacrificado, una única inyección icv del vector lentiviral HIV/GFP.

La Figura 2 pone de manifiesto que la administración del vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) a células epiteliales en cultivo obtenidas del plexo coroideo de ratas postnatales genera una pérdida de respuesta al IGF-I. Sólo en células infectadas con KR (HIV+KR+A β y HIV+KR+IGF+A β), pero no en las transfectadas con un vector HIV vacío (HIV), el IGF-I no promueve transición de péptido A β 1-40. *P<0,05 vs todos los demás grupos.

La Figura 3 muestra que el aprendizaje (A) y la memorización espacial (B) se encuentran disminuidos en ratas HIV/IGF-IR.KR ya que estas últimas aprenden más despacio y peor que las ratas control (HIV) en el test de Morris, consistente en memorizar la posición de una plataforma cubierta por el agua en una piscina donde el animal nada sin poder reposar más que en la plataforma. Ratas HIV/IGF-IR.KR: $r^2=0,8516$ vs ratas control $r^2=0,9884$, *P<0,05.

La Figura 4 muestra los niveles de A β en corteza cerebral (A) y en líquido cefalorraquídeo (LCR) (B) de ratas inyectadas con el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR). Mientras que se produce un incremento en los niveles cerebrales de A β hay un decremento en paralelo en el LCR, indicativo de una disminución en el aclaramiento de A β . Los niveles se determinaron por densitometría de inmunoblots utilizando anticuerpos anti-A β . Se muestran inmunoblots representativos. Se valoran también niveles de calbindina, una proteína neuronal, para mostrar que las diferencias no se deben a la cantidad de proteína total en cada grupo experimental. *P<0,05 vs control (ratas inyectadas con HIV vacío).

La Figura 5 muestra los niveles de tau hiperfosforilado (HPF-tau) en la corteza cerebral de ratas inyectadas con el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR). La Figura 5A muestra los niveles de HPF-tau en la corteza cerebral de ratas inyectadas con el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) y con el vector control (HIV-control). Los niveles se determinaron por densitometría de inmunoblots con anticuerpos anti-HPF-tau. *P<0,05 vs control. La Figura 5B muestra los resultados de un análisis por microscopía confocal de la localización tisular de los depósitos de HPF-tau. Los animales HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) (panel derecho), pero no los control (tratados con HIV, panel izquierdo), presentan acúmulos de HPF-tau (rojo) tanto dentro (flecha) como fuera (asterisco) de las neuronas (inmunopositivas para β tubulina, en verde) en zonas del telencéfalo. La señal intracelular amarilla-roja delata la colocalización de HPF-tau en neuronas. La Figura 5C muestra que los acúmulos extracelulares de HPF-tau contienen también ubiquitina. Se produce una colocalización (acúmulos amarillos, flecha) de depósitos HPF-tau (rojo) con ubiquitina (verde). Los animales control no presentan estos depósitos (datos no mostrados).

La Figura 6 muestra una neuropatología tipo Alzheimer en ratones con fondo genético modificado. La Figura 6A muestra que los ratones LID viejos (más de 15 meses) tratados con el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) [LID-HIV/IGF-IR.KR] prácticamente no aprendieron en el test de Morris. Mientras que ratones control viejos o LID que reciben sólo el vector viral control [LID-HIV] aprenden y retienen lo aprendido de forma similar, los ratones LID-HIV/IGF-IR.KR, donde la señalización del receptor de IGF-I en el plexo coroideo ha quedado anulada, aprenden significativamente peor (*P<0,001 vs controles). LID-HIV/IGF-IR.KR (n=5): $r^2=0,6320$, LID-HIV (n=7): $r^2=0,7379$, Controles de la misma edad (n=6), $r^2=0,7909$. La Figura 6B muestra que los animales LID-HIV/IGF-IR.KR presentan acúmulos de A β (inmunopositivos para A β , marcados con asteriscos en el panel a mayor aumento) en zonas telencefálicas que apenas se observan en los ratones controles LID-HIV (panel inferior).

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se relaciona con un animal no humano útil como modelo experimental, en adelante animal modelo de la invención, caracterizado porque presenta una alteración de la actividad biológica del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) localizada en las células del epitelio del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “animal no humano” se refiere a un animal mamífero no humano de cualquier fondo genético, preferentemente animales de laboratorio como roedores, más preferentemente ratas y ratones, o primates no humanos.

ES 2 246 715 B1

Tal como se utiliza en la presente invención el término “cualquier fondo genético” se refiere tanto a un animal no humano normal como a un animal no humano transgénico.

El término “normal”, aplicado a animal, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a animales que carecen de transgenes que podrían estar implicados en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer.

El término “transgénico”, aplicado a animal, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a animales que contienen un transgén que podría estar implicado en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer, e incluye, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a animales transgénicos del siguiente grupo: ratones LID (Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7324-7329), animales transgénicos portadores de mutaciones en presenilinas y β amiloide (Hock BJ, Jr., Lamb BT (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet* 17: S7-12), animales portadores de otras mutaciones y alteraciones (US20030229907, Transgenic non-human mammals with progressive neurologic disease; US20030145343, Transgenic animals expressing human p25; US20030131364, Method for producing transgenic animal models with modulated phenotype and animals produced therefrom; US20030101467, Transgenic animal model for Alzheimer disease; US20030093822, Transgenic animal model of neurodegenerative disorders; US6,717,031, Method for selecting a transgenic mouse model of Alzheimer's disease; US6,593,512, Transgenic mouse expressing human tau gene; US6,563,015, Transgenic mice over-expressing receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and mutant APP in brain and uses thereof; US6,509,515, Transgenic mice expressing mutant human APP and forming congo red staining plaques; US6,455,757, Transgenic mice expressing human APP and TGF-beta demonstrate cerebrovascular amyloid deposits; US6,452,065, Transgenic mouse expressing non-native wild-type and familial Alzheimer's Disease mutant presenilin 1 protein on native presenilin 1 null background; WO03053136, Triple transgenic model of Alzheimer disease; WO03046172, Disease model; US6563015, Transgenic mice over-expressing receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and mutant APP in brain and uses thereof; WO0120977, Novel animal model of Alzheimer disease with amyloid plaques and mitochondrial dysfunctions; EP1285578, Transgenic animal model of Alzheimer's disease) y animales transgénicos obtenidos mediante el cruce de cepas de ratones transgénicos con las distintas mutaciones que tienen lugar en la enfermedad de Alzheimer (Phinney AL, Horne P, Yang J, Janus C, Bergeron C, Westaway D (2003) Mouse models of Alzheimer's disease: the long and filamentous road. *Neurol Res* 25: 590-600; Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713; Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JN, B ohrmann B, M alherbe P, B rockhaus M, Loetscher H, C zech C, H uber G, Bluethmann H, Jacobsen H, Kemp JA (2003) PS2APP Transgenic Mice, Coexpressing hPS2mut and hAPPswe, Show Age-Related Cognitive Deficits Associated with Discrete Brain Amyloid Deposition and Inflammation. *J Neurosci* 23: 8989-900; US20030167486 Double transgenic mice overexpressing human beta secretase and human APP-London).

La alteración de la actividad biológica de la función del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales del animal modelo de la invención consistirá, en general, en la anulación funcional de su actividad biológica (anulación biológica).

Dicha alteración de la actividad biológica de la función del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales puede ser debida a la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I debido a la expresión de un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I. En una realización particular, dicho polinucleótido codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I humano. A modo ilustrativo, dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I humano se selecciona entre la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina y la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina (Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268: 2655-2661). El sistema de numeración utilizado para numerar los residuos de aminoácidos del receptor de IGF-I humano es el seguido por Ullrich *et al.* (Ullrich A. *et al.* (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-761; Ullrich A. *et al.* (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986 Oct; 5(10): 2503-2512).

Alternativamente, dicha alteración de la actividad biológica de la función del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales puede ser debida a la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I debido a la expresión de un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional. Tal como se utiliza en la presente invención el término “elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional” se refiere a una proteína, actividad enzimática o secuencia de nucleótidos, RNA o DNA, de

ES 2 246 715 B1

cadena sencilla o doble, que inhibe la traducción a proteína del mRNA del receptor de IGF-I. A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, o bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

El animal modelo de la invención puede tener cualquier fondo genético; no obstante, en una realización particular dicho animal modelo de la invención proviene de un animal normal, ventajosamente, de un animal normal sano, es decir, que carece de una patología diagnosticada, tal como una rata sana (Ejemplo 2), mientras que en otra realización particular dicho animal modelo de la invención proviene de un animal transgénico, tal como de un ratón transgénico LID (Ejemplo 3).

El animal modelo de la invención es un animal útil como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. Preferentemente, dichas enfermedades neurodegenerativas son enfermedades neurodegenerativas humanas, más preferentemente, enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa humana que cursa con demencia es la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer representa el 60% de los casos de demencia mientras que la enfermedad microvascular o multi-infarto representa un 20% de los mismos. Otras causas menores de demencia son el abuso crónico de alcohol y drogas y enfermedades neurológicas de muy baja incidencia como las enfermedades de Pick y Creutzfeldt-Jacob.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del animal modelo de la invención como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia; preferentemente, dichas enfermedades neurodegenerativas son enfermedades neurodegenerativas humanas, tales como enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Asimismo, el uso del animal modelo de la invención para el estudio de los mecanismos etiopatogénicos de enfermedades neurodegenerativas, en particular, enfermedades neurodegenerativas humanas y, más particularmente, enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer, así como el uso del animal modelo de la invención para la identificación y evaluación de compuestos potencialmente terapéuticos frente a dichas enfermedades constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

El animal modelo de la invención puede obtenerse mediante un proceso de transgénesis que permite la anulación funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal modelo de la invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención del animal modelo de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal modelo de la invención mediante un proceso de transgénesis.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “proceso de transgénesis” se refiere a cualquier técnica o procedimiento que permita la integración en una serie de células de un organismo vivo de un gen exógeno, o “transgén”, sin afectar a la totalidad de las células de dicho organismo, y que confiere a dichas células y al organismo que las porta una nueva propiedad biológica. Dicho transgén o gen exógeno se refiere a un ADN normalmente no residente, ni presente en la célula que se pretende transformar.

Por otro lado, el proceso de transgénesis para obtener el animal modelo de la invención puede ser aplicado tanto a animales completamente desarrollados como a embriones del mismo siempre que permita la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal modelo completamente desarrollado.

En una realización particular, dicho proceso de transgénesis que conduce a la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I comprende la transformación de células epiteliales del plexo coroideo de un animal no humano completamente desarrollado, de manera que expresen una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal no humano de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I con el fin de transformar dichas células epiteliales del plexo coroideo de manera que expresen dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I. Ventajosamente, dicha construcción génica está incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación estable de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales, preferentemente, vectores virales ya que la transgénesis con vectores virales tiene la ventaja de poder dirigir con relativa precisión la expresión de un gen foráneo en tejidos adultos y es una de las razones por las

ES 2 246 715 B1

que se plantea su uso general para terapia génica (Pfeifer A, Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 177-211).

5 La invención se ha ejemplificado mediante el empleo de vectores lentivirales. Estos vectores son de fácil manejo y entre sus principales ventajas destaca su eficaz transducción, su integración genómica y su expresión persistente o pro-
longada. Otros vectores virales apropiados incluyen vectores retrovirales, adenovirales o adenoasociados (Consiglio
A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, Marchesini S, Cestari V, Oliverio A,
Bordignon C, Naldini L (2001) *In vivo* gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction
of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med* 7: 310-316; Kordower JH,
10 Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden
JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration
prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290: 767-773).
Ejemplos de vectores lentivirales incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1), del que se han
desarrollado numerosos vectores apropiados. Otros lentivirus adecuados para su empleo como vectores incluyen el
15 grupo de lentivirus de primates incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (HIV-2), el virus de
la inmunodeficiencia humana de tipo 3 (HIV-3), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), el retrovirus
del SIDA de los simios (SRV-1), el virus linfotrópico de células T humanas tipo 4 (HTLV4), así como los grupos de
lentivirus bovinos, lentivirus equinos, lentivirus felinos, lentivirus ovinos/caprinos y lentivirus murinos.

20 La invención proporciona un vector, tal como un vector viral, específicamente, un vector lentiviral, útil para obtener
un animal modelo de la invención, el cual es útil como un modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas,
concretamente, como modelo de enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la
enfermedad de Alzheimer. Dicho vector así como su obtención se describirá de forma detallada más adelante.

25 La administración de dicha construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos
codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I, o de dicho vector que comprende dicha
construcción génica, a las células epiteliales del plexo coroideo del animal no humano a transformar puede llevarse a
cabo por cualquier método convencional; no obstante, en una realización particular, la administración de dicho vector
a dichas células epiteliales del plexo coroideo se lleva a cabo mediante inyección intracerebroventricular (icv).

30 Tal como se utiliza en la presente invención el término "una forma mutada no funcional dominante del receptor de
IGF-I" incluye cualquier forma mutada del receptor de IGF-I que actúe como dominante negativo por recombinación
con el receptor de IGF-I normal endógeno, anulando su función biológica, en el curso del procedimiento desarrollado
por la presente invención. Dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I es expresada por células
35 epiteliales del plexo coroideo del animal modelo de la invención como consecuencia de su transformación con una
construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótido codifica dicha forma mutada no
funcional dominante del receptor de IGF-I. En una realización particular, dicho polinucleótido codifica una forma mu-
tada no funcional dominante del receptor de IGF-I humano. En otras realizaciones particulares, dicho polinucleótido
codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I de una especie animal distinta a la humana,
40 tal como un mamífero, por ejemplo, un roedor o un primate no humano.

Aunque prácticamente cualquier forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I puede ser utilizada
con el fin de conseguir la anulación funcional de la actividad biológica (anulación biológica) del receptor de IGF-I,
45 en una realización particular, dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I se selecciona entre
las formas mutadas no funcionales del receptor de IGF-I humano denominadas IGF-IR.KR e IGF-IR.KA en esta
descripción, definidas previamente.

El animal no humano cuyas células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales van a ser transfor-
madas mediante la administración del transgén puede tener cualquier fondo genético.

50 El procedimiento de la invención se materializa, en una realización concreta, en un procedimiento para la obtención
de un animal modelo de la invención en el que el vector utilizado es el vector lentiviral derivado de HIV-1 denominado
HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) en esta descripción, la forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la
forma mutada no funcional del receptor de IGF-I humano denominada IGF-IR.KR y el animal no humano cuyas
55 células epiteliales del plexo coroideo han sido transformadas es una rata normal adulta sana (Ejemplo 2).

Adicionalmente, el procedimiento de la invención se materializa, en otra realización concreta, en un procedimiento
para la obtención de un animal modelo de la invención en el que el vector utilizado es el vector lentiviral denominado
HIV/IGF- IR.KR (HIV/KR), la forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no
60 funcional del receptor de IGF-I humano denominada IGF-IR.KR y el animal no humano cuyas células epiteliales del
plexo coroideo han sido transformadas es un ratón transgénico LID (Ejemplo 3).

Alternativamente, tal como se mencionó previamente, la alteración de la actividad biológica de la función del
receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales puede ser debida a la
65 anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I debido a la expresión de un polinucleótido cuya secuencia de
nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad
funcional.

ES 2 246 715 B1

Por tanto, en otra realización particular, dicho proceso de transgénesis de anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I comprende la transformación de células epiteliales del plexo coroideo de un animal no humano mediante la introducción de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad biológica, seleccionándose dicho elemento inhibidor entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I,
- b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I,
- c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

Ventajosamente, dicha construcción génica está incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia. Las características de dicho vector han sido definidas previamente.

Las secuencias de nucleótidos a)-d) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína del receptor de IGF-I, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) *Transgenesis Techniques. Principles and Protocols*, 2ª Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Ferández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 75-97; Kikuchi, *et al.*, 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22 (3): 326-330).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector útil para la puesta en práctica del procedimiento de obtención del animal modelo de la invención. Dicho vector puede ser un vector no viral o, ventajosamente, un vector viral, tal como se ha mencionado previamente, y comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I o bien un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional, junto con, opcionalmente, los elementos necesarios para permitir su expresión en células de animales no humanos. Dichos vectores pueden estar en forma de partículas virales artificiales o quiméricas.

En una realización particular, dicho vector, es un vector lentiviral que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se seleccionada entre una secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I y una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I se selecciona entre las formas mutadas no funcionales del receptor de IGF-I humano denominadas IGF-IR.KR e IGF-IR.KA en esta descripción, definidas previamente.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional se selecciona entre una secuencia que codifica: a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I, b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I, c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

La invención proporciona, en una realización concreta, un vector lentiviral obtenible mediante transfección transitoria en células empaquetadoras de:

un plásmido (i) que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- una secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I, y
- una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional;

un plásmido (ii) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev;

un plásmido (iii) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el elemento de respuesta a Rev (RRE); y

un plásmido (iv) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envoltura heteróloga del vector.

ES 2 246 715 B1

Aunque prácticamente cualquier célula empaquetadora apropiada puede ser utilizada, en una realización particular, dichas células empaquetadoras pertenecen a la línea celular 293T, una línea de células epiteliales renales humanas transformadas disponibles comercialmente.

5 El plásmido (i) es un vector, tal como un vector de transferencia o de expresión, que lleva una construcción génica que comprende el transgén en cuestión y un promotor funcional en las células empaquetadoras que permite que el vector que se transcribe se genere de forma eficiente en las células empaquetadoras. En una realización particular, dicho plásmido (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I seleccionada entre las formas mutadas no funcionales del receptor de IGF-I humano denominadas
10 IGF-IR.KR e IGF- IR.KA en esta descripción, definidas previamente. En otra realización particular, dicho plásmido (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional seleccionada entre una secuencia que codifica: a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I, b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I, c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.
15

El plásmido (ii) es un vector no solapante que, virtualmente, puede contener la secuencia de nucleótidos que codifica cualquier proteína Rev, la cual promueve la acumulación citoplasmática de los transcritos virales; no obstante, en una realización particular, dicho plásmido (ii) es el plásmido identificado como RSV-Rev, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev del virus del sarcoma de Rous (RSV).
20

El plásmido (iii), es un vector de empaquetado condicional, y contiene la secuencia de nucleótidos que codifica cualquier elemento de respuesta a Rev (RRE) apropiado, al que se une, de forma que el genes e exprese y se produzcan las nuevas partículas virales.
25

El plásmido (iv) contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la envoltura heteróloga del vector, por lo que puede contener la secuencia de nucleótidos que codifica cualquier proteína de la envuelta de un virus apropiada, con la condición de que dicho virus no sea un lentivirus; no obstante, en una realización particular, dicho plásmido es el denominado p-VSV, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV).
30

Dicho vector lentiviral puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

En una realización particular, dicho vector lentiviral es el denominado HIV/IGF- IR.KR (HIV/KR) (Ejemplo 1) que permite la expresión de la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que tiene la mutación K1003R en la secuencia de aminoácidos del receptor IGF-I humano, en células animales no humanas, y la anulación biológica del receptor de IGF-I y el desarrollo de un animal no humano útil como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer.
35

En otra realización particular, dicho proceso de transgénesis que conduce a la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo del animal modelo de la invención comprende un proceso de transgénesis convencional en la fase embrionaria de dicho animal de tal forma que las futuras células del plexo coroideo de dicho animal son transformadas genéticamente y pierden la capacidad de responder al IGF-I. El desarrollo de este tipo de animal transgénico puede ser llevado a cabo por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre animales transgénicos (Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev.* 1997 Jan 1; 11(1): 1-10. Bedell MA, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions. *Genes Dev.* 1997 Jan 1; 11(1): 11-43).
40
45

Una posibilidad de la presente invención es un procedimiento de transgénesis convencional por la cual se dirige la expresión de un transgén que comprende un promotor específico de tejido (como por ejemplo el promotor del gen de la transtirretina, Ttr¹) (Schreiber, G. The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. *Clin. Chem. Lab Med.* 40, 1200-1210 (2002)) y un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I. De esta forma la forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I únicamente se expresará en las células del plexo coroideo obteniéndose así el animal modelo de la presente invención. En una realización particular, dicho polinucleótido codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I humano. A modo ilustrativo, dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I humano se selecciona entre la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina y la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina (Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268: 2655-2661).
50
55
60
65

Alternativamente, dicha alteración de la actividad biológica de la función del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales de dichos animales transgénicos puede ser obtenida por la

anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I debido a la expresión de un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional. Tal como se utiliza en la presente invención y, se ha comentado anteriormente, el término “elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional” se refiere a una proteína, actividad enzimática o secuencia de nucleótidos, RNA o DNA, de cadena sencilla o doble, que inhibe la traducción a proteína del mRNA del receptor de IGF-I. A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, o bien un polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

Igualmente, se puede obtener un animal modelo de la invención por transgénesis convencional en el que la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I pueda ser regulada por distintos mecanismos lo que permitiría un mejor control y uso del animal. Así, una técnica de transgénesis regulada, puede consistir en el uso del sistema “Cre/Lox” mediante el cruce de animales con secuencias transgénicas Lox-IGF-IR (sistemas de “knock in”) que sustituyan a la secuencia IGF-IR endógena, con animales que tengan a la recombinasa bacteriana Cre dirigida por un promotor específico de tejido, de nuevo por ejemplo el de la transtirretina (Isabelle Rubera, Chantal Poujeol, Guillaume Bertin, Lilia Hasseine, Laurent Counillon, Philippe Poujeol and Michel Tauc (2004) Specific Cre/Lox Recombination in the Mouse Proximal Tubule. *J Am Soc Nephrol.* 15 (8): 2050-6; Ventura A, Meissner A, Dillon CP, McManus M, Sharp PA, Van Parijs L, Jaenisch R, Jacks T. (2004) Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (28): 10380-5). Otro ejemplo para generar otro modelo animal transgénico regulable consistiría en el uso del sistema “tet-off”(Rennel E, Gerwins P. (2002) How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem.* 309 (1): 79-84; Schonig, K, Bujard H. (2003) Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. In: *Transgenic Mouse Methods and Protocols*, Hofker, M, van Deursen, J (eds.) Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 69-104). Una realización ejemplarizante de la presente invención consistirá en un ratón Lox-IGF-IR que se cruza con un ratón Tre-Cre - donde Tre es el promotor regulable por la proteína Tta (tetracycline-controlled transactivator protein); posteriormente este híbrido se cruza con un ratón Ttr-Tta de tal manera que el ratón resultante: Lox-IGF-IR/Tre-Cre/Ttr-Tta eliminará la función IGF-IR en respuesta a la administración de tetraciclina, compuesto que elimina la acción de la proteína Tta.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un vector de la invención en un procedimiento para la obtención de un animal no humano útil como modelo experimental, tal como un modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas, en particular, enfermedades neurodegenerativas humanas, especialmente, como modelo de enfermedades neurodegenerativas humanas que cursan con demencia, tal como la enfermedad de Alzheimer.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Generación de un vector viral para expresión transgénica sostenida

Se generó un vector viral como vehículo genético para introducir en las células epiteliales del plexo coroideo la forma mutada del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR. Esa forma mutada del receptor de IGF-I, IGF-IR.KR, presenta la mutación K1003R en la que el residuo de lisina en la posición 1003 ha sido sustituido por un residuo de arginina, y actúa como dominante negativo por recombinación con el receptor normal endógeno, anulando su función (Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268: 2655-2661).

Se ha utilizado un vector lentiviral que presenta características de expresión prolongada (Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, M archesini S, C estari V, O liverio A, B ordignon C, N aldini L (2001) *In vivo* gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med* 7: 310-316; Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, C hen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson’s disease. *Science* 290: 767-773), derivado del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), utilizando como envoltura viral la del virus de la estomatitis vesicular (VSV), producido por transfección transitoria y empaquetado de vectores plasmídicos en células 293T seguido de la concentración de dichas partículas virales mediante ultracentrifugación. Se ha generado un virus HIV de tercera generación mediante modificaciones de métodos ya publicados (Dull HB (1988) Behind the AIDS mailer. *Am J Prev Med* 4: 239-240). Para ello se emplearon cuatro construcciones de forma similar a lo descrito anteriormente (Bosch A, Perret E, Desmaris N, Trono D, Heard JM. Reversal of pathology in the entire brain of mucopolysaccharidosis type VII mice alter lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gen Ther* 8: 1139-1150, 2000):

- (i) un vector no solapante, RSV-Rev, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev del virus del sarcoma de Roux (RSV);

ES 2 246 715 B1

- (ii) un vector de empaquetado condicional, p-RRE, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el elemento de respuesta a Rev (RRE);
- (iii) un vector, p-VSV, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envoltura heteróloga del vector, en concreto, la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV); y
- (iv) un vector de transferencia, que lleva una construcción génica para el transgén en cuestión, en este caso, el IGF-IR.KR, y el promotor de la fosfogliceroquinasa, que permite que el vector que se transcribe se genere de forma eficiente en las células empaquetadoras (293T).

Los tres primeros vectores [1]-3] son conocidos (véanse las referencias mencionadas previamente). La construcción de este último vector se llevó a cabo introduciendo un fragmento HincII-XbaI del cDNA del receptor de IGF-I que codifica una forma mutada del receptor de IGF-I, concretamente la forma mutada del receptor denominada IGF-IR.KR que contiene la mutación K1003R en la que el residuo de lisina de la posición 1003 ha sido sustituido por un residuo de arginina (Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). J Biol Chem 268: 2655-2661), en el vector HIV-lacZ (Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272: 263-267). Brevemente, el cDNA que codifica la forma mutada del receptor de IGF-I que tiene la mutación K1003R (IGF-IR.KR) se introdujo en HIV-lacZ, mediante un intercambio del cassette lacZ por el cDNA que codifica IGF-IR.KR según metodología descrita (Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H, Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. Mol Ther 4: 149-156). Para ello, el vector HIV-lacZ se cortó con *SmaI/XbaI* para eliminar el cDNA de lacZ y se ligó con el cDNA que codifica IGF-IR.KR cortado con *HincII/XbaI*. Los sitios de restricción son homólogos. De este modo se obtuvo el vector de transferencia que lleva el transgén IGF-IR.KR.

El vector lentiviral, denominado HIV/IGF-IR.KR o HIV/KR en esta descripción, se obtuvo por transfección transitoria en las células 293T. Los plásmidos RSV-Rev, A-RRE, p-VSV y el vector de transferencia que lleva el transgén IGF-IR.KR son empaquetados de forma episomal en dichas células 293T (Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H, Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. Mol Ther 4: 149-156). La línea celular 293T (obtenible comercialmente a través de American Type Culture Collection) es una línea de células epiteliales renales humanas transformadas que expresan el antígeno T de SV40 lo que permite la replicación episomal de los plásmidos y de la región del promotor. Previamente, se sembraron dichas células, en una densidad de $1-5 \times 10^6$ en placas de 10 cm de diámetro 24 horas antes de la transfección en un medio DMEM con 10% de suero fetal y penicilina (100 IU/ml). En la transfección se utilizó un total de 32,75 μg de DNA plasmídico por plato: 3 μg del plásmido p-VSV, 3,75 μg del plásmido RSV-Rev y 13 μg tanto del plásmido p-RRE como del plásmido de transferencia que lleva el transgén IGF-IR.KR. El precipitado se obtuvo añadiendo dichos plásmidos a 250 μl de H_2O y 250 μl de CaCl_2 0,5M, mezclando bien y añadiendo gota a gota a 5 00 μl de tampón salino-HEPES 2X (NaCl 280 mM, HEPES 100 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, pH 7,12). A la vez que se agitaba, inmediatamente se añadió el precipitado a cada plato de cultivo. Se cambiaron 10 ml de medio a las 24 horas y finalmente se recogió al cabo de otras 24 horas, limpiándose con una centrifugación de baja velocidad y pasándose por filtros de acetato de celulosa (0,22 μm). Finalmente, y tras una serie de ultracentrifugaciones las partículas o vectores lentivirales, HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR), se resuspendieron en tampón salino-fosfato (PBS/BSA) para su posterior uso. Brevemente, en primer lugar se filtró el medio de cultivo de las placas con las células 293T a través de un filtro de 0,45 μm . Ese medio se centrifugó a 4°C durante 1 hora y media a 19.000 rpm. El precipitado se resuspendió en 1% de PBS/BSA, se dejó 1 hora en hielo y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 1 hora y media a 19.000 rpm. Se volvió a resuspender en 1% de PBS/BSA, se dejó otra hora en hielo y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante final se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Esta misma metodología se utilizó para purificar las partículas de HIV vacías y las partículas de HIV/GFP. Las partículas de HIV vacías (o vector HIV vacío), que corresponden a HIV-lacZ cortado con *SmaI/XbaI*, y las partículas de HIV/GFP ya han sido descritas previamente (Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H, Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. Mol Ther 4: 149-156).

Ejemplo 2

Expresión del vector lentiviral en células epiteliales del plexo coroideo

Para analizar la expresión de vectores lentiviral en células epiteliales del plexo coroideo se procedió a construir un vector lentiviral HIV/GFP que contenía el gen codificante de la GFP como transgén. Brevemente, el cDNA del gen de la proteína GFP (Clontech) fue subclonado en un vector de transferencia HIV-1 [(pHR'CMV)-PGK en Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H, Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. Mol Ther 4: 149-156], en los sitios de restricción *BamHI/Sall*, siguiendo la descripción detallada del Ejemplo 1, con lo que se obtuvo el vector lentiviral denominado HIV/GFP.

ES 2 246 715 B1

A continuación, los animales, ratas macho de 5-6 meses de edad (n=7), se sometieron a una inyección mediante cirugía estereotáxica con jeringa Hamilton, bajo anestesia con tribromoetanol, de 6 μ l del vector HIV/GFP en cada ventrículo lateral (coordenadas estereotáxicas: 1 mm posterior al bregma, 1,2 mm lateral y 4 mm de profundidad), a un 1 μ l por minuto. A los 6 meses se les sacrificó y se observó la presencia del transgén mediante fluorescencia. Para ello, el animal se perfundió transcárdialmente con 4% de paraformaldehído. Posteriormente, el cerebro se cortó en vibratomo en cortes de 50 μ m, los cortes se montaron seguidamente sobre portas gelatinizados y la fluorescencia de la proteína GFP se observó directamente al microscopio de fluorescencia (Leica).

De este modo se determinó que la administración en ratas adultas mediante inyección intracerebroventricular (icv) del vector lentiviral HIV/GFP (vector usado en la invención con el gen codificante de la proteína autofluorescente GFP como transgén) resulta en la expresión sostenida de la proteína GFP en el plexo coroideo (Figura 1).

Ejemplo 3

15 *Transformación de células del epitelio de plexos coroideos con el vector lentiviral HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR)*

La monocapa de células epiteliales se obtuvo mediante un protocolo ya descrito (Strazielle, N. & Ghersi-Egea, J.F. (1999) Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J. Neurosci.* 19: 6275-6289). Se sacrificaron ratas de entre 5 y 7 días y los plexos coroideos de los ventrículos laterales y cuarto se extrajeron rápidamente colocándose en un medio DMEM de cultivo sobre hielo. Seguidamente se procedió a su digestión enzimática con 1 mg/ml pronasa (Sigma) y 12,5 μ g/ml DNase I (Boehringer Mannheim), con dispersión mecánica simultánea durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugó (1.000 rpm) y las células se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 10 ng/ml de EGF (Epidermal Growth Factor) (Sigma), 5 ng/ml de FGF (Fibroblast Growth Factor) (Boehringer Mannheim) y gentamicina. Estas células se transformaron con el vector lentiviral HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) y con el vector HIV vacío, de la forma que se indica a continuación. Brevemente, tras 24 horas en cultivo, se cambió el medio por DMEM fresco conteniendo el virus (al menos 50 μ g/ml, diluido entre 10^{-2} y 10^{-3}) y 8 μ g/ml de polybrene (Sigma). Este medio infeccioso se reemplazó a las 24 horas, se mantuvieron las células durante un día más y, finalmente, tras aspirar el medio, las células se lisaron y procesaron.

De este modo se observó que la administración del vector lentiviral HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) a células epiteliales en cultivo obtenidas del plexo coroideo de ratas postnatales generó una pérdida de respuesta al factor trófico IGF-I. Sólo en células infectadas con el vector HIV/KR, pero no en las transfectadas con el vector HIV vacío, el IGF-I no promovió translocación del péptido A β 1-40 (Figura 2). La translocación se cuantificó determinando la cantidad de A β 1-40 que pasa desde la cámara superior del cultivo a la inferior, para lo cual tiene que atravesar una monocapa de células epiteliales (Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397).

Ejemplo 4

40 *Desarrollo de neuropatología tipo Alzheimer en ratas adultas sanas*

Se infectaron ratas adultas sanas de la cepa Wistar con el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR). Para ello, se inyectó mediante cirugía estereotáxica con jeringa Hamilton, bajo anestesia con tribromoetanol, 6 μ l del vector HIV/IGF-IR.KR en ratas macho de 5-6 meses de edad en cada ventrículo lateral (coordenadas estereotáxicas: 1 mm posterior al bregma, 1,2 mm lateral y 4 mm de profundidad), a 1 μ l por minuto. Los animales controles recibieron, en las mismas condiciones, igual cantidad de vector viral HIV vacío (HIV). A los 5 meses se les analizó su capacidad cognitiva mediante el test de Monis de aprendizaje espacial en el que participa el hipocampo, estructura típicamente afectada en Alzheimer (Clark CM, Karlawish JH (2003) Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* 138: 400-410), siguiendo metodología estandarizada (Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21: 1628-1634). Este test, conocido como "laberinto acuático" (o test de Monis) determina la memorización espacial (van der Staay FJ (2002) Assessment of age-associated cognitive deficits in rats: a tricky business. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 753-759), que es uno de los déficits característicos de la enfermedad de Alzheimer. Al finalizar el test se le sacrificó (6 meses después de la inyección del vector viral) y se perfundieron a través de la arteria aorta con tampón salino, e, inmediatamente, se extrajo el cerebro, conservándose a -80°C un hemisferio para su posterior procesamiento por "western blot" y el otro hemisferio se fijó mediante inmersión 24 horas en 4% de paraformaldehído para su estudio inmunohistoquímico.

Se determinaron los niveles de amiloide (A β) cerebral y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) por técnicas de western blot, ELISA y por inmunocitoquímica, siguiendo metodología ya descrita (Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor 1 regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397) y niveles de tau hiperfosforilada (HPF-tau) en corteza también por western blot e inmunocitoquímica (Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397). Asimismo, se evaluó la presencia de depósitos de HPF-tau y de amiloide por técnicas inmunocitoquímicas (Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397).

ES 2 246 715 B1

Los animales con la señalización de IGF-I bloqueada en el plexo coroideo por administración del vector HIV/IGF-IR.KR presentaron déficits cognitivos significativos en el aprendizaje y en memorización espacial (Figuras 3A y 3B).

Además, se observó un incremento significativo en los niveles de $A\beta$ del parénquima cerebral comparado con los animales controles y en paralelo, una disminución de los niveles de AP en el LCR (Figuras 4A y 4B). Ambas alteraciones son típicas de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe DJ (2001) Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron* 32: 177-180; Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, Bartko JJ, Cohen RM (2003) Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 289: 2094-2103). Junto a esta amiloidosis se apreció un acúmulo intra y extracelular de HPPF-tau en regiones telencefálicas (Figura 5). Los acúmulos extracelulares contienen también ubiquitina (Figura 5C) y son también característicos de la enfermedad de Alzheimer (Clark CM, Karlawish JH (2003) Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* 138: 400-410). Además, los animales padecieron alteraciones celulares tipo Alzheimer ya que presentaron gliosis reactiva en asociación a los depósitos proteicos y déficits significativos de proteínas sinápticas (Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen L A, McKeel DW, Jr., Monis JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56: 127-129).

En resumen, los animales inyectados con el vector lentiviral de expresión prolongada HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) presentaron características neuropatológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer: altos niveles cerebrales de amiloide, presencia de agregados intra y extracelulares de tau hiperfosforilado y ubiquitina y déficits cognitivos.

Ejemplo 5

Desarrollo de neuropatología tipo Alzheimer en ratones con fondo genético modificado (ratones LID)

Otro ejemplo de la invención consistió en generar cambios patológicos tipo Alzheimer en ratones de origen transgénico. Los ratones elegidos son, además, viejos, para imitar mejor las condiciones normales donde se desarrolla la patología de Alzheimer en seres humanos.

Se inyectó el vector HIV/IGF-IR.KR (HIV/KR) a ratones transgénicos LID de más de 15 meses y con genotipo manipulado. Los ratones transgénicos empleados en este ejemplo son deficientes en IGF-I sérico por haber sido anulado el gen hepático del IGF-I por el sistema Cre/Lox (ratones LID) (Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci US* 96: 7324-7329). Los ratones LID ya presentan, *per se*, algunas de las características de la enfermedad de Alzheimer ya que el déficit de IGF-I genera amiloidosis y gliosis (Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397). Además, al ser viejos, presentan déficits cognitivos y amiloidosis (Bronson RT, Lipman RD, Harrison DE (1993) Age-related gliosis in the white matter of mice. *Brain Res* 609: 124-128; van der Staay FJ (2002) Assessment of age-associated cognitive deficits in rats: a tricky business. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 753-759). El objetivo de este ensayo fue obtener unas condiciones más favorables a la producción de amiloidosis con el fin de determinar si el sistema proporcionado por esta invención llega a generar depósitos de amiloide, una de las características de la enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos y reactivos utilizados se describen en los ejemplos anteriores. Los animales fueron sacrificados a los 3 meses de la inyección de los vectores virales.

Tan sólo 3 meses después de la administración del vector HIV/KR los ratones LID viejos presentan déficits cognitivos severos (Figura 6A), y amiloidosis y taupatia similares a los observados en ratas adultas tras 6 meses de exposición al vector viral (resultados similares a los descritos en Figuras 4 y 5, datos no mostrados). Lo importante es que en este modelo se consigue un estado más avanzado de la enfermedad: los animales presentan acúmulos de amiloide, que aún no siendo congofílicos (no se tiñen con el marcador de placas insolubles "Rojo Congo") presentan características típicas de placas difusas (Figura 6B).

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un animal no humano útil como modelo experimental **caracterizado** porque presenta una alteración de la actividad biológica del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I(IGF-I) localizada en las células del epitelio del plexo coroideo de los ventrículos cerebrales.
2. Animal según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha alteración de la actividad biológica del receptor de IGF-I consiste en su anulación biológica.
- 10 3. Animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque es un mamífero.
4. Animal según la reivindicación 3, **caracterizado** porque se selecciona entre un roedor y un primate.
- 15 5. Animal según la reivindicación 4, **caracterizado** porque es una rata o un ratón.
6. Animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicha alteración de la función del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo es debida a la expresión de una forma mutada no funcional dominante de dicho receptor IGF-I.
- 20 7. Animal según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina.
- 25 8. Animal según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina.
- 30 9. Animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque es un animal normal.
10. Animal según la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicho animal es una rata normal sana.
- 35 11. Animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque es un animal transgénico.
12. Animal según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicho animal transgénico es un ratón transgénico LID.
- 40 13. Animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, útil como modelo experimental de una enfermedad neurodegenerativa.
14. Animal según la reivindicación 13, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es la Enfermedad de Alzheimer.
- 45 15. Un procedimiento para la obtención de un animal no humano útil como modelo experimental según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende la anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo de dicho animal no humano mediante un proceso de transgénesis.
- 50 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho proceso de transgénesis de anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I comprende la administración a células epiteliales del plexo coroideo de un animal no humano desarrollado de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I, o de un vector que comprende dicha construcción génica, para transformar dichas células epiteliales del plexo coroideo de manera que expresen dicha forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I.
- 55 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la administración de dicha construcción génica o de dicho vector a dichas células epiteliales del plexo coroideo se lleva a cabo mediante inyección intracerebroventricular (icv).
- 60 18. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho vector se selecciona entre un vector viral y un vector no viral.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho vector viral es un vector lentiviral.
- 65 20. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina.

ES 2 246 715 B1

21. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina.

22. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho animal no humano es un animal no humano normal.

23. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho animal no humano es un animal no humano transgénico.

24. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho proceso de transgénesis de anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I comprende la transformación de células epiteliales del plexo coroideo de un animal no humano mediante la introducción de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad biológica, o un vector que comprende dicha construcción génica, en donde dicho elemento inhibidor se selecciona entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I,
- b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I,
- c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

25. Un vector lentiviral obtenible mediante transfección transitoria en células empaquetadoras de:

un plásmido (i) que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- una secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I, y
- una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional;

un plásmido (ii) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev;

un plásmido (iii) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el elemento de respuesta a Rev (RRE); y

un plásmido (iv) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envoltura heteróloga del vector.

26. Vector según la reivindicación 25, en el que dicho plásmido (i) es un plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una forma mutada no funcional del receptor de IGF-I seleccionada entre la secuencia de nucleótidos que codifica la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina y la secuencia de nucleótidos que codifica la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina.

27. Vector según la reivindicación 25, en el que dicho plásmido (i) es un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad funcional seleccionada entre una secuencia de nucleótidos que codifica: a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I, b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I, c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

28. Vector viral según la reivindicación 25, en el que:

dichas células empaquetadoras son células 293T;

dicho plásmido (i) es el plásmido definido en la reivindicación 27 ó 28;

dicho plásmido (ii) es el plásmido identificado como RSV-Rev, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev del virus del sarcoma de Rous (RSV);

dicho plásmido (iii) es el plásmido identificado como p-RRE, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el elemento de respuesta a Rev (RRE); y

ES 2 246 715 B1

dicho plásmido (iv) es el plásmido identificado como pVSV, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

5 29. Uso de un vector según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en un procedimiento para la obtención de un animal no humano útil como modelo experimental según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24.

10 30. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho proceso de transgénesis de anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo comprende la administración de una construcción génica que comprende promotor específico de plexo coroideo y un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica una forma mutada no funcional dominante del receptor de IGF-I, o de un vector que comprende dicha construcción génica, a células embrionarias de dicho animal no humano.

15 31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KR que presenta la mutación K1003R, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de arginina.

20 32. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicha forma mutada no funcional dominante del receptor IGF-I es la forma mutada no funcional del receptor de IGF-I denominada IGF-IR.KA que presenta la mutación K1003A, en la que el residuo de lisina de la posición 1003 de la secuencia de aminoácidos del receptor de IGF-I humano ha sido sustituido por un residuo de alanina.

25 33. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho proceso de transgénesis de anulación de la actividad funcional del receptor de IGF-I en las células epiteliales del plexo coroideo comprende la administración de una construcción génica que comprende promotor específico de plexo coroideo y un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen del receptor de IGF-I capaz de anular su actividad biológica, o un vector que comprende dicha construcción génica a células embrionarias de dicho animal no humano, en donde dicho elemento inhibidor se selecciona entre:

- 30 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA del receptor de IGF-I,
b) una ribozima específica del mRNA del receptor de IGF-I,
35 c) un aptámero específico del mRNA del receptor de IGF-I, y
d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA del receptor de IGF-I.

40 34. Procedimiento según la reivindicaciones 30 a la 33, en el que dicho promotor específico de tejido es el promotor del gen transtirretina.

35 35. Procedimiento según la reivindicaciones 30 a la 34, en el que dicho proceso de transgénesis es inducible.

45 36. Uso de un animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 como modelo para el estudio del mecanismo etiopatogénico de una enfermedad neurodegenerativa o para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a dicha enfermedad.

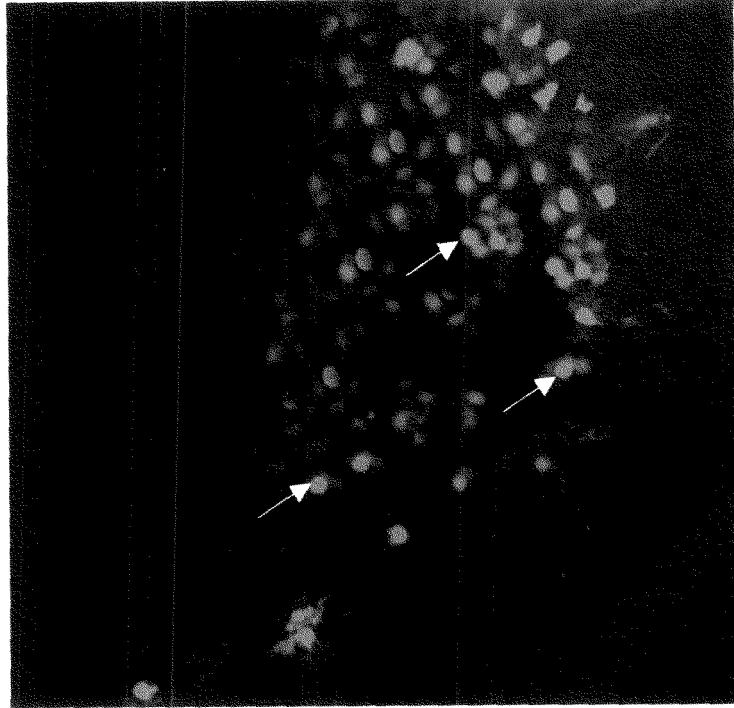
37. Uso, según la reivindicación 36, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con demencia.

50 38. Uso, según la reivindicación 36 ó 37, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa humana.

55 39. Uso, según la reivindicación 36, de un animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 como modelo para el estudio de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Alzheimer o para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a dicha enfermedad.

60

65



Plexos coroideos

Figura 1

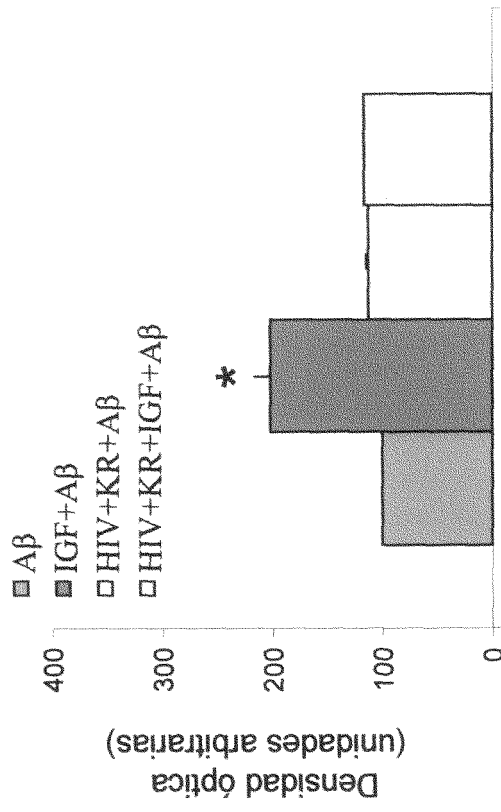
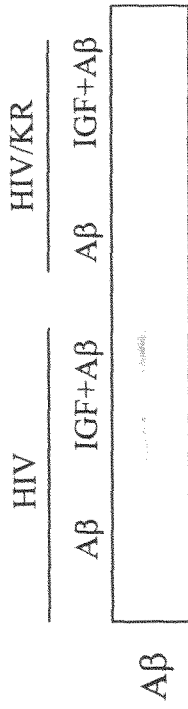


Figura 2

Test de Morris

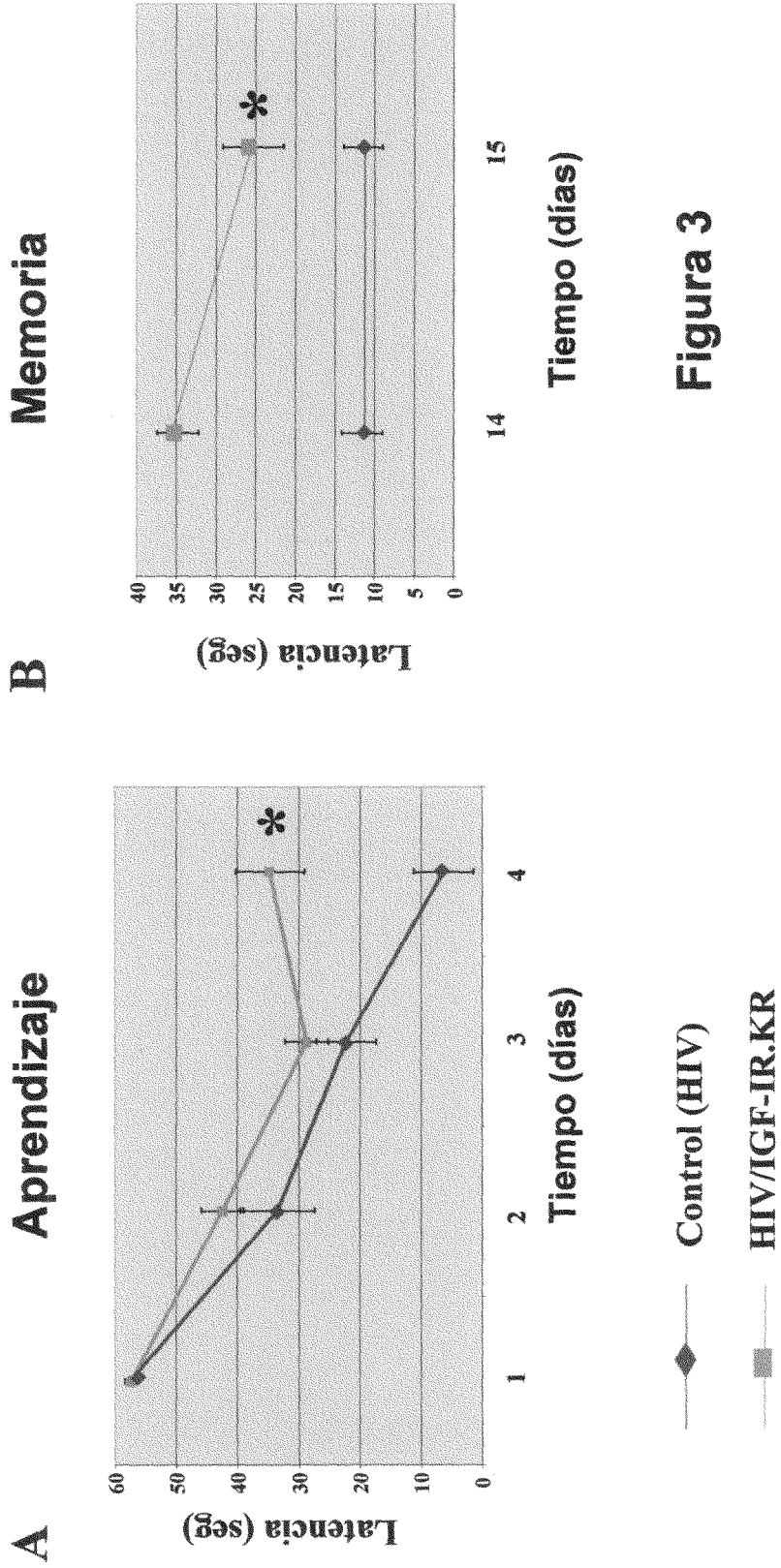


Figura 3

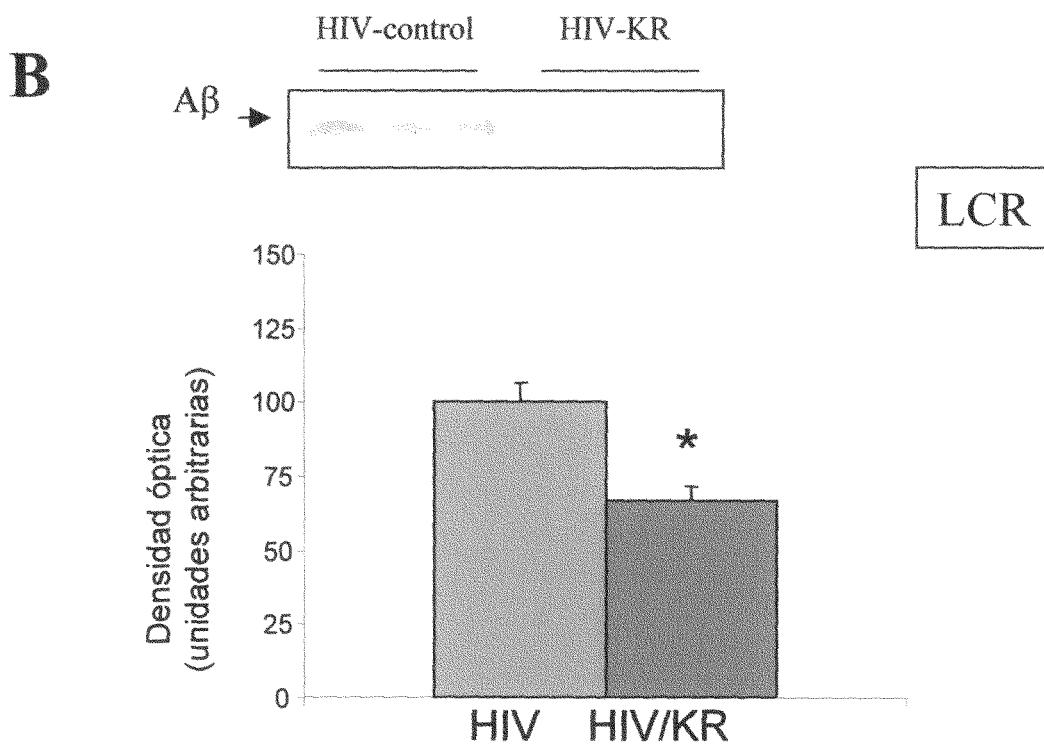
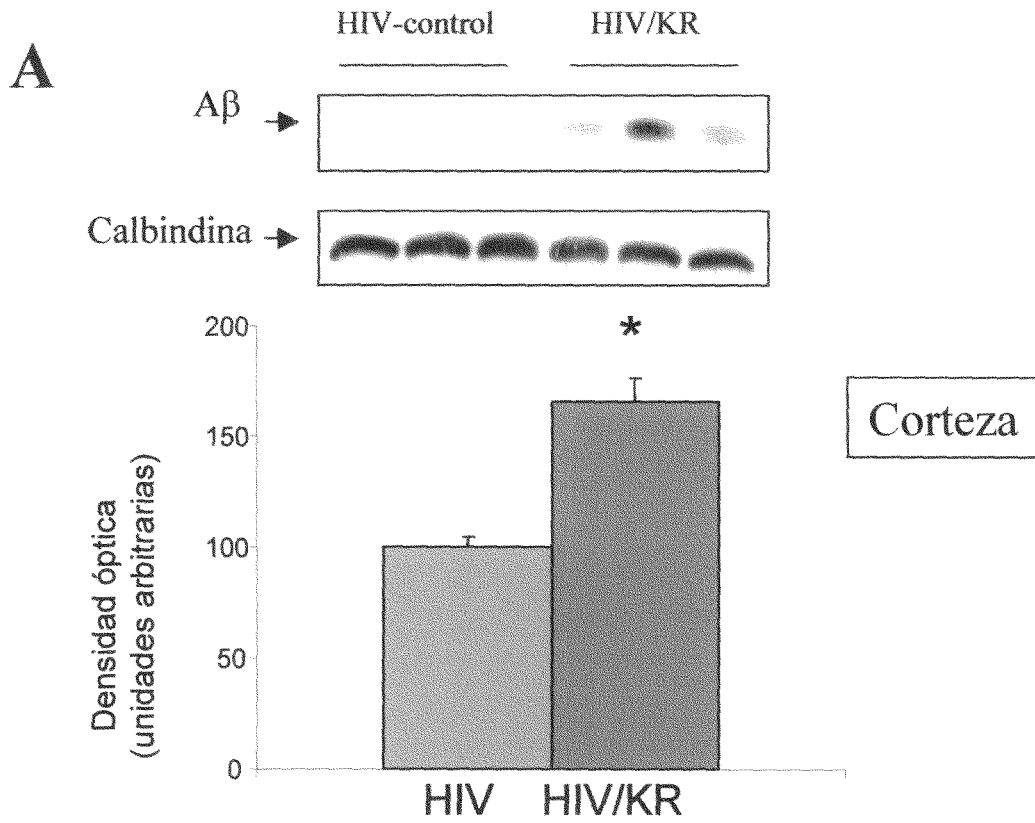


Figura 4

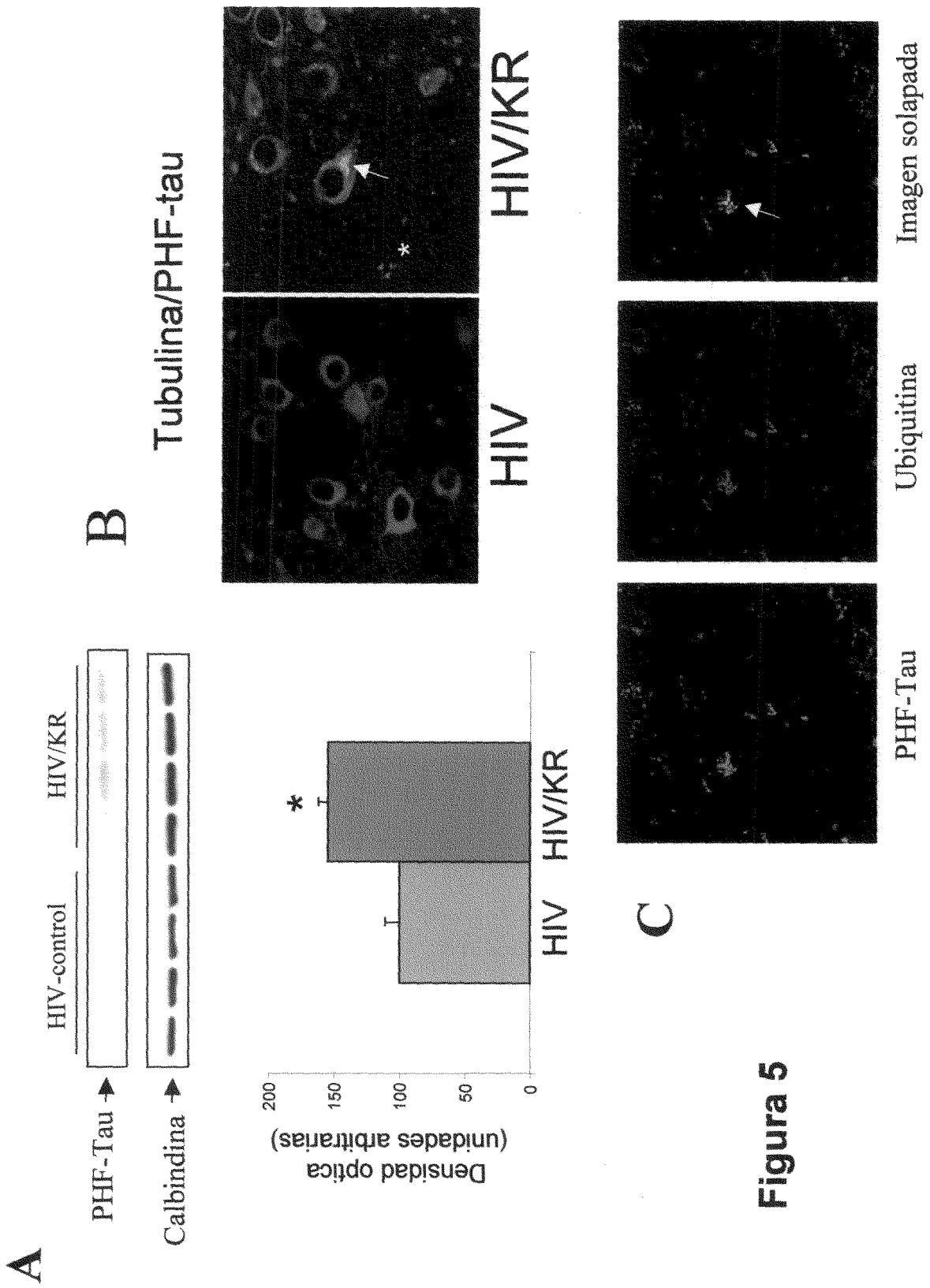
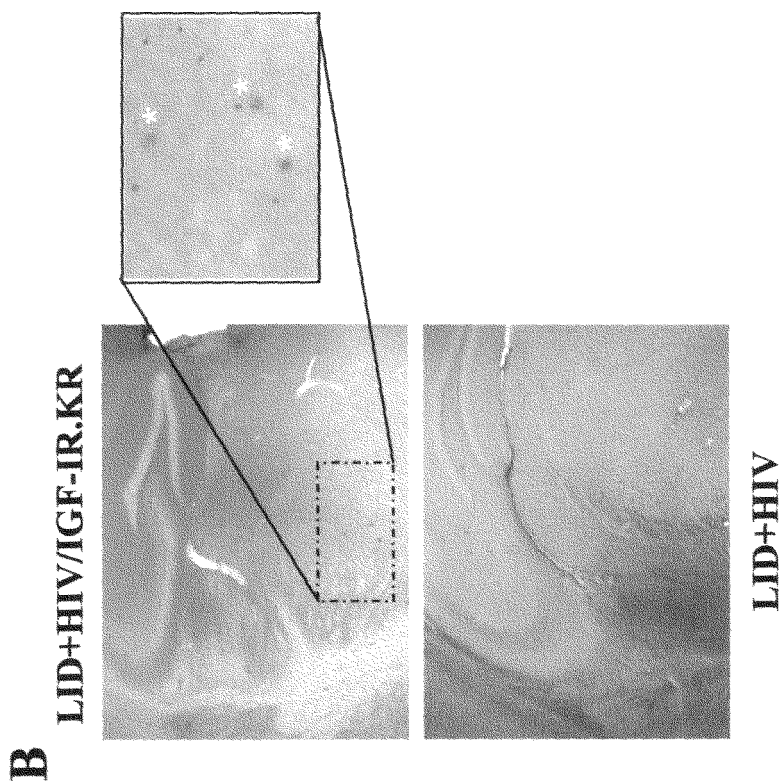
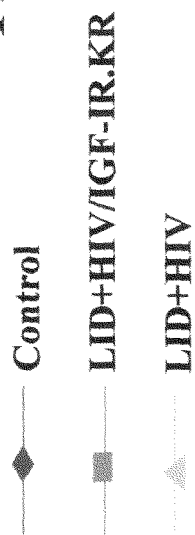
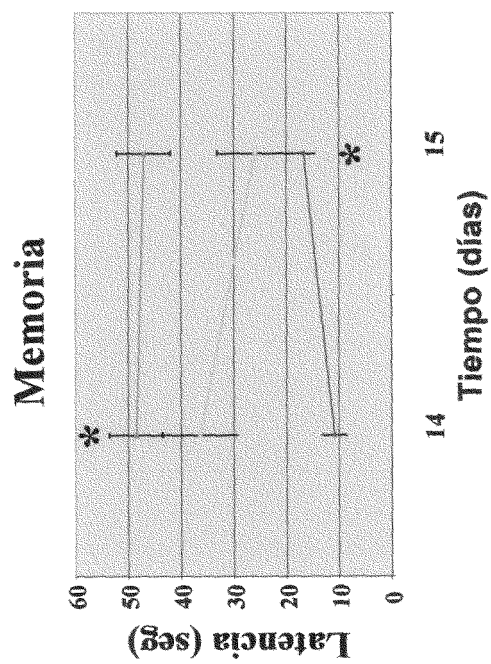
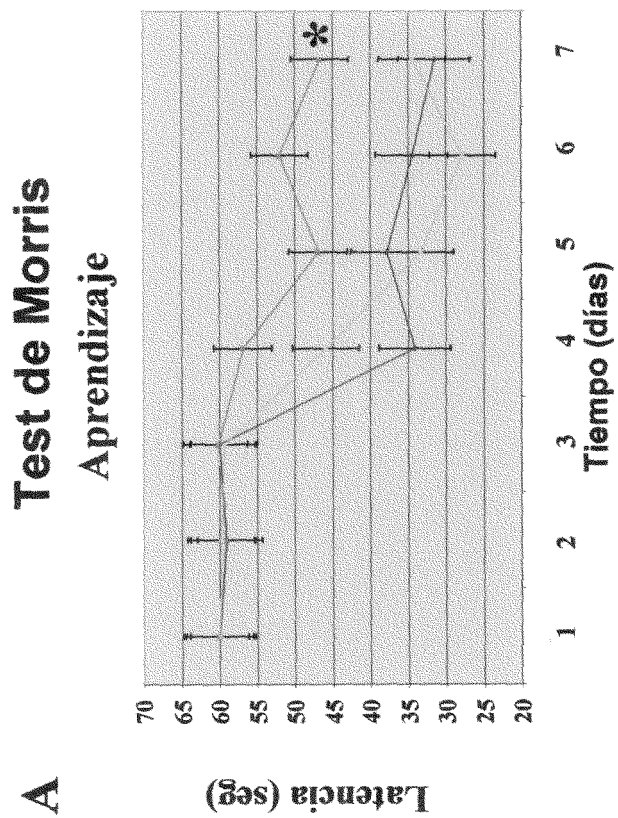


Figura 5

Figura 6





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 246 715

② Nº de solicitud: 200401946

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.08.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KATO H. et al. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I mimetic antibody (alpha IR-3)". Febrero 1993. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 268 (4), páginas 2655-2661.	1-35
A	KALEBIC et al. "Expression of a kinase-deficient IGF-I-R supresses tumorigenicity of rhabdomyosarcoma cells constitutively expressing a wild type IGF-I-R". 1998. Int. J. Cancer. Vol. 76, páginas 223-227.	1-35
A	WO 9737010 A1 (IMMUNOGEN INC.) 09.10.1997, página 5, línea 10 - página 6, línea 25; página 46, líneas 1-5; tabla I.	1-12, 15-24, 25-35
A	CHODOBSKI A. et al. Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis". Enero 2001. Microscopy Research and Technique. Vol. 52 (1), páginas 65-82.	1-17,30-35
A	SCHREIBER et al. "The evolution of transthyretin synthesis in the chroid plexus". 2002. Clin. Chem. Lab. Med. Vol. 40 (12), páginas 1200-1210.	30-35

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 28.10.2005	Examinador A. Collados Martín Posadillo	Página 1/2
---	---	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)