



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 636**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02785441 .3**
96 Fecha de presentación : **11.11.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1449920**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Ratón transgénico usado como modelo para patologías humanas con origen en células stem.**

30 Prioridad: **27.11.2001 ES 200102630**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73 Titular/es: **Universidad de Salamanca (O.T.R.I.)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

72 Inventor/es: **Sánchez García, Isidro y
Pérez Losada, Jesús**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 311 636 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

Ratón transgénico usado como modelo para patologías humanas con origen en células stem.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a ratones transgénicos que reproducen la patología humana que tiene su origen en células stem, utilizando como estrategia la expresión de los genes involucrados en dicha patología en seres humanos mediante un promotor que dirige la expresión de un transgén en células Sca-1⁺.

10 **Antecedentes de la invención**

Los animales transgénicos son animales que portan un gen exógeno (transgén) en su genoma, que les ha sido introducido en células germinales del animal, o en un antecesor del mismo, en una etapa temprana del desarrollo. La introducción de un transgén en un animal puede tener como finalidad el estudio del comportamiento, expresión o función del gen introducido. Alternativamente, puede perseguir una mejora genética en el individuo afectado con fines terapéuticos o de mejora animal.

La generación de mamíferos transgénicos está bien establecida [véase, por ejemplo, Hogan, Constantini & Lacy (1986), "Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1986)] y prueba de ello es el elevado número de artículos y patentes que describen mamíferos transgénicos. A modo ilustrativo, pueden citarse las patentes norteamericanas US 4.736.866, US 4.873.191, US 5.175.383 y US 5.175.384, entre otras.

La expresión de un transgén puede conferir un nuevo fenotipo al mamífero. Dependiendo del transgén insertado y de su nivel de expresión en el mamífero, éste puede hacerse más o menos susceptible a una enfermedad determinada. Tales mamíferos transgénicos son modelos valiosos para el estudio *in vivo* de compuestos que potencialmente podrían ser útiles en el tratamiento o prevención de dicha enfermedad y/o en el desarrollo de métodos útiles para el diagnóstico de dicha enfermedad.

Bajo la denominación "patología humana que tiene su origen en células stem" se incluye a un grupo de enfermedades humanas, tanto neoplásicas como no neoplásicas, que tienen su origen en células stem, tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas, por ejemplo, leucemias mieloides, leucemias linfoides de estirpe B, leucemias linfoides de estirpe T, linfomas, sarcomas y patología de desarrollo de células stem, por ejemplo, inmunodeficiencias congénitas, anemia de Fanconi, etc. La patología neoplásica maligna (cuya práctica totalidad tiene su origen en células stem) es tratada actualmente en los seres humanos mediante una combinación de estrategias de quimioterapia y radioterapia y/o cirugía, estrategias que no discriminan entre células normales y tumorales. El tratamiento terapéutico de la patología no-neoplásica se realiza mediante terapias sustitutivas (inmunoglobulinas, vacunas, transfusiones, etc.).

Durante los últimos años se han identificado los genes activados y/o generados por anomalías cromosómicas asociadas tanto a tumores hematopoyéticos como sólidos [Annu. Rev. Genetics (1997) 31:429-453]. A pesar de su identificación no se dispone actualmente de modelos animales que reproduzcan dicha patología [Oncogene (1999) 18:5248; Oncogene (1999) 18:5249-5252], aunque se haya demostrado que dichos genes son tumorigénicos *in vivo* [Current Genomics (2000), 10 1:71-80]. Asimismo, recientemente, se ha demostrado que la diana donde se inicia el cáncer es una célula stem [Blood (2000) 95:1007-1113; On-cogene (2000) 19(20):2413-2422; Nature (2001) 414: 105-1111]. En Current Genomics (2000), 1:71-80 se mencionan unos modelos conocidos de ratones que expresan genes o fusiones génicas que se activan por anomalías cromosómicas asociadas con distintas patologías, por ejemplo, leucemia mieloi-de crónica (BCR-ABL^{p210}) leucemia linfoblástica aguda de estirpe B (BCR-ABL^{p190}), leucemia linfoblástica aguda de estirpe T (HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1), etc. Sin embargo, dichos modelos sólo han puesto de manifiesto que las proteínas expresadas por dichos genes o fusiones génicas son tumorigénicas, pero no han reproducido específicamente la patología humana con la que se asocian.

A la vista de los efectos tan devastadores que produce la patología humana con origen en células stem, existe la necesidad de desarrollar animales apropiados que proporcionen un modelo *in vivo* para estudiar dicha patología humana así como compuestos potencialmente útiles en el tratamiento y/o prevención de dicha patología.

Sumario de la invención

La invención se enfrenta con el problema de desarrollar ratones modelos que reproduzcan la patología humana que tiene su origen en células stem.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el descubrimiento de que ratones transgénicos que contienen una construcción de ADN que comprende un gen que se crea y/o activa por anomalías cromosómicas asociadas a distintos tipos de leucemia, o bien por la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias, estando dicho gen bajo el control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺, tales como las células stem, desarrollan niveles variables de neoplasia, con origen en células stem hematopoyéticas o no hematopoyéticas. Al dirigir la expresión de los diferentes genes al compartimento de células stem mediante el empleo de un promotor que dirige la expresión de tales genes en células Sca-1⁺ se ha conseguido generar un conjunto de ratones modelos que

reproducen la patología humana. Este hecho ha sido demostrado mediante la generación de un conjunto de ratones transgénicos que poseen unos genotipos que confieren una mayor tendencia al desarrollo de patología humana con origen en células stem cuando se comparan con ratones no transgénicos. Los ratones transgénicos proporcionados por esta invención constituyen, por tanto, un nuevo y útil modelo para el estudio de dichas enfermedades y para la evaluación de compuestos útiles para el tratamiento y/o la prevención de dichas enfermedades.

Los ratones modelo que reproducen la patología humana con origen en células stem proporcionados por esta invención permiten: a) disponer de una herramienta única para estudiar cómo se genera, se mantiene y desarrolla dicha patología; b) predecir la eficacia de terapias potencialmente válidas para seres humanos; c) descubrir nuevas terapias, y d) hacer identificaciones genómicas de alelos que supriman o aumenten la evolución natural de cada patología.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye el uso de ADN que comprende un gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, estando dicho gen bajo el control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un ratón transgénico que posee un genotipo que confiere una mayor tendencia al desarrollo de patología humana con origen en células stem cuando se compara con la de un mamífero no transgénico. Dicho ratón transgénico es útil, entre otros fines, para estudiar dicha patología y evaluar compuestos potencialmente útiles para tratar y/o prevenir dicha patología. Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye un ratón transgénico que contiene un transgén y su progenie.

En una realización particular, dicho ratón transgénico se selecciona del grupo formado por Sca-1+BCR-ABL^{P210}, Sca-1+BCR-ABL^{P190}, Sca-1+Slug, Sca-1+Snail, Sca-1+HOX11, Sca-1+RHOM2/LMO-2, Sca1+TAL1.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la preparación de un ratón transgénico útil como modelo animal para el estudio *in vivo* de patología humana con origen en células stem.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una línea celular de ratón transgénico contiene en su genoma dicha construcción de ADN.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de un promotor que dirige la expresión de un gen en células Sca-1⁺ para la generación de modelos animales que reproducen la patología humana con origen en células stem.

Otro objeto adicional de esta invención 12 constituye el empleo de dicho ratón transgénico en la evaluación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de patología humana con origen en células stem.

Otros objetos resultarán aparentes para un experto en la materia a la vista de la descripción y reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 consta de un conjunto de gráficas y fotografías que constituyen la demostración fenotípica e histológica de ratones Sca-1⁺BCR-ABL^{P210} con leucemia mieloide crónica. La Figura 1A muestra el análisis representativo de la composición celular presente en la médula ósea (BM) y en la sangre periférica (PB) de ratones Sca-1⁺BCR-ABL^{P210}. Células aisladas de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} se tiñeron con los anticuerpos monoclonales indicados [Gr-1, para la serie granulocítica; Mac1 para la serie mielomonocítica y Sca1 para la serie stem] y se analizaron mediante citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células positivas. La distribución de células positivas para Gr-1 + Mac1 y Gr-1+Sca1 se muestra de acuerdo al tamaño (size, SSC) y la granularidad (forward, FSC). La Figura 1B muestra el resultado del examen histológico representativo de secciones de bazo, hígado y nódulos linfáticos de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} con leucemia mieloide crónica. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las flechas indican la presencia de fibrosis y megacariocitos típicos del proceso de leucemia mieloide crónica. La Figura 1C muestra una tinción representativa de la sangre periférica de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} teñida con Giemsa.

La Figura 2 consta de un conjunto de gráficas y fotografías que constituyen la demostración fenotípica e histológica de crisis blástica mieloide y linfoide en ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} con leucemia mieloide crónica. La Figura 2A muestra el análisis representativo de la composición celular presente en la médula ósea (BM), bazo y en la sangre periférica (PB) de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} en crisis blástica. Células aisladas de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} en crisis blástica se tiñeron con los anticuerpos monoclonales indicados [Gr-1, para la serie granulocítica; Mac1 para la serie mielomonocítica; B220 para la serie linfoide B, y Sca1 para la serie stem] y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra un ejemplo de crisis blástica linfoide B (PB#1) y otro de crisis blástica mieloide (PB#2). La distribución de células positivas para Gr-1 + Mac1 se muestra de acuerdo al tamaño (size, SSC). La Figura 2B muestra el resultado del examen histológico representativo de secciones de hígado de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} con crisis blástica. Todas las secciones se tiñeron con hematosilina y eosina. Se observa la infiltración hepática por las células leucémicas. La Figura 2C muestra una tinción representativa de la sangre periférica de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P210} en crisis blástica teñida con Giemsa donde se aprecian las células blásticas.

La Figura 3 consta de un conjunto de gráficas y fotografías que constituyen la demostración fenotípica e histológica de ratones Sca-1+BCR-ABL^{P190} con leucemia aguda linfoblástica de estirpe B. La Figura 3A muestra el análisis de ADN mediante Southern Blot de ratones Sca1+BCR-ABL^{P190} y controles hibridados con una sonda específica para ABL. Se observa la presencia del transgén (p190) en ratones Sca1+BCR-ABL^{P190}. La figura 3B muestra los resultados del examen histológico representativo de secciones de bazo, hígado, pulmón y tinciones de sangre periférica de ratones controles y Sca-1+BCR-ABL P190. Todas las secciones histológicas se tiñeron con hematosilina y eosina y las tinciones de sangre periférica con Giemsa y evidenciaron la presencia de células leucémicas en los ratones Sca-1+BCR-ABL^{P190}. La figura 3C muestra el análisis representativo de la composición celular presente en la médula ósea (BM) y en la sangre periférica (PB) de ratones controles y ratones Sca-1+BCR-ABL^{P190}. Células aisladas de ratones controles y ratones Sca1+BCR-ABL^{P190} se tiñeron con los anticuerpos monoclonales indicados [Mac1 para la serie mielomonocítica; B220, CD19 y CD43 para la serie linfoide y Sca1 para la serie stem] y se analizaron mediante citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células neoplásicas en los ratones Sca1+BCR-ABL^{P190}. La distribución de células neoplásicas para B220/CD19 se muestra de acuerdo al tamaño (size, SSC) y la granularidad (forward/FSC).

15 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un ratón que contiene en su genoma una construcción de ADN, en adelante construcción de ADN usada en la invención, que comprende un gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, estando dicho gen bajo el control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺. Dicha anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem se selecciona entre las anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias. Las alteraciones del receptor c-kit o su ligando, el stem cell factor (SCF) son un ejemplo de patología humana asociada con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias.

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem”, en adelante, gen activable, se refiere a un gen o fusión génica que cuando se incorpora en el genoma de un mamífero aumenta la probabilidad de que dicho mamífero desarrolle la patología a la que está asociado dicho gen o fusión génica. En una realización particular, dicho gen activable es un gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem seleccionada entre las anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias. A modo ilustrativo, dicho gen activable se selecciona entre los genes identificados como BCR-ABL^{P210}, BCR-ABL^{P190}, Slug, Snail, HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1. De forma más concreta, en una realización particular, dicho gen activable se selecciona entre los siguientes genes:

40 BCR-ABL^{P210} humano, fusión génica que se produce como consecuencia de la t(9;22)(q34;q11) y se asocia a leucemia mieloide crónica; los pacientes que presentan esta anomalía cromosómica desarrollan con el tiempo una crisis blástica, que es un fenómeno evolutivo característico de dicha enfermedad;

45 BCR-ABL^{P190} humano, un oncogén generado por la translocación cromosómica t(9;22) y asociado a leucemia linfoblástica aguda de estirpe B;

45 Slug murino, un gen que participa en la movilización de células stem hematopoyéticas;

Snail murino, un gen de la familia Slug que participa en la migración de células stem embrionarias;

50 HOX11 humano, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T;

RHOM2/LMO-2 humano, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T; y

55 TAL1 murino, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T.

Los genes activables identificados como BCR-ABL^{P210}, BCR-ABL^{P190}, HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1 se describen en Annu. Rev. Genet. (1997) 31:429-453; el gen Slug ha sido descrito por Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG and Cooke J (1994) “Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc-finger gene”. Science 264: 835-849; y el gen Snail ha sido descrito por Jiang, R, Lan, Y, Norton, CR, Sundberg, JP, and Gridley, T (1998) “The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice”. Developmental Biology 198:277-285; Sefton, M, Sanchez, S, and Nieto, MA (1998) “Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo”. Development 125:3111-3121; y Hemavathy, K, Ashraf, SI, and Ip, YT (2000) “Snail/slug family of repressors: slowly going finto the fast lane of development and cancer”. Gene 257:1-12. Estos genes activables pueden obtenerse en base a la información proporcionada por las publicaciones previamente mencionadas. Aunque se ha particularizado para unas cuantas realizaciones particulares, las enseñanzas de la presente invención son aplicables a cualquier gen o fusión génica creado y/o activado por una anomalía cromosómica

ES 2 311 636 T3

presente en el cáncer. Información relacionada con tales genes o fusiones génicas puede encontrarse, por ejemplo, en Annu. Rev. Genet. (1997) 31:429-453.

5 El promotor que dirige la expresión del gen activable en células Sca-1⁺ es una secuencia de ácido nucleico implicada, y necesaria, en el inicio de la transcripción, que dirige la expresión del gen activable en células Sca-1⁺ e incluye el sitio de unión de la ARN polimerasa. Dentro del contexto de la presente invención, el término “promotor” puede incluir otros sitios en los que pueden unirse proteínas reguladoras de la transcripción. En una realización particular, el promotor que dirige la expresión del gen activable en células Sca-1⁺ es el promotor pLy-6E.1 de ratón o un fragmento funcional del mismo, es decir, capaz de dirigir la expresión específica de tejido de los diferentes transgenes en ratones. 10 El promotor pLy-6E.1 está bien caracterizado y contiene todos los elementos necesarios para la expresión selectiva en células Sca-1⁺ [Miles C, Sanchez M-J, Sinclair A, and Dzierzak, E. (1997) “Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo”. Development 124:537-547].

15 La expresión “operativamente unida” se refiere a la orientación del promotor con respecto a la secuencia del gen activable. El promotor se coloca de tal manera que es capaz de controlar o regular la expresión de dicho gen activable.

20 La construcción de ADN usada en la invención puede obtenerse fácilmente por métodos convencionales de digestión con enzimas de restricción y unión, y similares tales como los descritos por Sambrook, Fitch and Maniatis, eds., (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

La construcción de ADN usada en la invención puede utilizarse, si se desea, para la producción de vectores útiles para transformar embriones de mamífero y generar animales transgénicos utilizando métodos convencionales tales como los descritos por Sambrook *et al.*, citado *supra*.

25 Alternativamente, la construcción de ADN usada en la invención puede utilizarse para la obtención de un fragmento lineal de ADN útil para la microinyección de ADN a oocitos fertilizados con el fin de generar ratones transgénicos. Dicho fragmento lineal de ADN útil para microinyección puede obtenerse mediante corte con enzimas de restricción con el fin de obtener un fragmento lineal de ADN que comprende el gen activable.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un ratón transgénico que contiene en su genoma una construcción de ADN de la invención, que comprende un gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, por ejemplo, anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias, estando dicho gen bajo el control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺. El ratón transgénico proporcionado por esta invención posee, consecuentemente, un genotipo que confiere una mayor tendencia al desarrollo de patología humana con origen en células stem cuando se compara con la de un mamífero no transgénico. Dicho ratón transgénico es útil, entre otros fines, para estudiar dicha patología y evaluar compuestos potencialmente útiles para tratar y/o prevenir dicha patología. 35

40 En una realización particular, el ratón transgénico proporcionado por esta invención es un ratón transgénico identificado como:

Sca-1+BCR-ABL^{p210}: estos ratones desarrollan leucemia mieloide crónica;

45 **Sca-1+BCR-ABL^{p190}**: estos ratones desarrollan leucemia linfoblástica aguda de estirpe B;

Sca-1+Slug: estos ratones movilizan células stem hematopoyéticas;

Sca-1+Snail: estos ratones movilizan células stem embrionarias;

50 **Sca-1+HOX11**: estos ratones desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T;

Sca-1+RHOM2ILMO-2: estos ratones desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T; y

55 **Sca-1+TAL 1**: estos ratones desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T.

60 Para la generación de ratones transgénicos proporcionado por esta invención, la construcción de ADN usado en la invención ha sido introducida en dicho mamífero, o en un antecesor del mismo, en un estadio embriogénico, por ejemplo, en el estadio de una célula, u oocito fertilizado, y, generalmente, no más tarde del estadio de 8 células.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de ratones transgénicos que posee una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, que comprende:

65 (i) introducir una construcción de ADN usada en la invención en un oocito fecundado de un mamífero no humano transgénico;

(ii) implantar dicho oocito fecundado en una madre nodriza pseudopreñada para producir descendencia; y

ES 2 311 636 T3

- (iii) analizar dicha descendencia para evaluar la existencia de genes activados y/o creados por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem.

En una realización particular, dicha anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem es una patología humana seleccionada entre las anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias (por ejemplo, alteraciones del receptor ckit o de su ligando (SCF)), en cuyo caso, se analiza la descendencia para evaluar la existencia de genes activados y/o creados por la anomalía cromosómica asociada a la patología humana con origen en células stem en cuestión.

Existen diversos medios conocidos por el estado de la técnica mediante los cuales una secuencia de ácido nucleico puede ser introducida en un embrión de un animal de forma que pueda ser incorporada cromosómicamente en un estado activado, todos los cuales pueden ser aplicados en la generación de ratones transgénicos de la presente invención. Un método consiste en transfectar el embrión con dicha secuencia de ácido nucleico tal como ocurre de forma natural, y seleccionar los animales transgénicos en los que dicha secuencia se ha integrado en el cromosoma en un locus que da como resultado la activación de dicha secuencia. otro método implica modificar la secuencia de ácido nucleico, o sus Secuencias de control, antes de introducirla en el embrión. Otro método consiste en transfectar el embrión utilizando un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico a introducir.

En una realización particular, la introducción de la construcción de ADN usada en la invención en la línea germinal de un ratón se realiza mediante microinyección de un fragmento de ADN lineal que comprende el gen activable operativamente unido al promotor que dirige la expresión en células Sca-1⁺ en oocitos fecundados de mamífero no humano.

Los oocitos fecundados pueden aislarse por métodos convencionales, por ejemplo, provocando la ovulación de la hembra, bien en respuesta a cópula con un macho o bien mediante inducción por tratamiento con hormona luteinizante. En general, se induce una súper ovulación en las hembras por acción hormonal y se cruzan con machos. Al cabo de un periodo de tiempo apropiado, las hembras se sacrifican para aislar los oocitos fecundados de sus oviductos, los cuales se mantienen en un medio de cultivo apropiado. Los oocitos fecundados pueden ser reconocidos al microscopio por la presencia de pronúcleos. La microinyección del fragmento de ADN lineal se realiza, ventajosamente, en el pronúcleo masculino.

Tras la introducción del fragmento lineal de ADN que comprende la construcción de ADN usada en la invención en los oocitos fecundados, éstos se incuban *in vitro* durante un periodo de tiempo apropiado o bien se reimplantan en madres nodriza pseudopreñadas (obtenidas haciendo copular hembras con machos estériles). La implantación se realiza por métodos convencionales, por ejemplo, anestesiando las hembras e insertando quirúrgicamente un número suficiente de embriones, por ejemplo, 10-20 embriones, en los oviductos de las madres nodriza pseudopreñadas. Finalizada la gestación, algunos embriones llevarán a término la gestación y darán lugar a ratones transgénicos, los cuales teóricamente deben llevar la construcción de ADN usada en la invención integrada en sus genomas y presente en todas las células del organismo. Esta progenie es la generación GO y sus individuos son los "fundadores transgénicos". La confirmación de que un individuo ha incorporado el ácido nucleico inyectado y es transgénico se obtiene analizando los individuos de la progenie. Para ello, a partir de una muestra de material del ratón, por ejemplo, a partir de un trocito de cola del ratón (en caso de que sea, por ejemplo, un ratón) o de una muestra de sangre, se extrae el ADN de cada individuo y se analiza por métodos convencionales, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando unos iniciadores específicos o bien mediante análisis Southern blot o Northern blot utilizando, por ejemplo, una sonda que es complementaria a, al menos, una parte del transgén, o bien mediante análisis Western blot utilizando un anticuerpo frente a la proteína codificada por el transgén. Otros métodos para evaluar la presencia del transgén incluyen, sin limitación, ensayos bioquímicos apropiados, tales como ensayos enzimáticos y/o inmunológicos, tinciones histológicas para marcadores particulares, actividades enzimáticas, etc.

En general, en animales transgénicos, el transgén insertado se transmite como un carácter mendeliano por lo que no es difícil establecer líneas estables de tales individuos. Si los individuos de la GO se cruzan con la cepa paterna (retrocruzamiento) y el transgén se comporta como un carácter mendeliano, el 50% de la progenie será heterocigótico para el transgén insertado (hemizigóticos). Estos individuos constituyen la progenie G1 y una línea transgénica que se puede mantener indefinidamente apareando hemizigóticos de la G1 con individuos normales. Alternativamente, individuos de la G1 pueden cruzarse entre sí para producir un 25% de homocigóticos para el transgén insertado, un 50% de hemizigóticos y un 25% sin transgén siempre y cuando el transgén no afecte a la viabilidad de la descendencia.

La progenie de ratón transgénico proporcionado por esta invención, puede obtenerse por tanto, mediante copulación del ratón transgénico con un individuo apropiado, o bien mediante fertilización *in vitro* de huevos y/o espermatozoides de los ratones transgénicos. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "progenie" o "progenie de un ratón transgénico" se refiere a todos y cada uno de los descendientes de cada generación posterior a la de los ratones originalmente transformados. La progenie puede ser analizada para detectar la presencia del transgén mediante cualquiera de los métodos citados previamente.

La invención también se refiere a una línea celular de ratón transgénico que contiene en su genoma una construcción de ADN usada en la invención, es decir, una construcción que comprende un gen que se crea y/o activa por una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, por ejemplo, anomalías

ES 2 311 636 T3

cromosómicas asociadas con a leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias, estando dicho gen bajo el control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺.

5 En otro aspecto, la invención se refiere al empleo de un promotor que dirige la expresión de un gen en células Sca-1⁺ para la generación de ratones que reproducen la patología humana, neoplásica, que tiene su origen en células stem, hematopoyéticas o no hematopoyéticas, tales como ratones que presentan una anomalía cromosómica asociada a una patología humana con origen en células stem, por ejemplo, una anomalía cromosómica asociada a la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o a la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias. En una realización particular, dicho promotor que dirige
10 la expresión de un gen en células Sca-1⁺ es el promotor pLy-6E.1 de ratón.

El ratón transgénico proporcionado por esta invención, su progenie o la línea celular proporcionada por esta invención, son útiles para, entre otras aplicaciones, evaluar compuestos potencialmente útiles para tratar y/o prevenir una
15 anomalía cromosómica asociada a patología humana, neoplásica, que tiene su origen en células stem, hematopoyéticas o no hematopoyéticas, por ejemplo, anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias. Por tanto, la invención también se refiere al empleo de dicho ratón transgénico, su progenie o una línea celular proporcionada por esta invención, en la evaluación de compuestos potencialmente útiles
20 para tratar y/o prevenir una anomalía cromosómica asociada a patología humana que tiene su origen en células stem. En una realización particular, dicha anomalía cromosómica se selecciona entre las anomalías cromosómicas asociadas a la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o a la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias.

25 En ratones transgénicos, la evaluación del compuesto potencialmente útil para el tratamiento y/o prevención de dicha patología humana con origen en células stem se puede realizar administrando el compuesto a ensayar a dicho ratón, a distintas dosificaciones, y evaluar la respuesta fisiológica del ratón a lo largo del tiempo. La administración del compuesto a ensayar puede ser por vía oral o parenteral dependiendo de la naturaleza química del compuesto a evaluar. En algunos casos puede ser apropiado administrar el compuesto en cuestión junto con co-factores que potencien la
30 eficacia del compuesto.

En el caso de las líneas celulares de la invención, la evaluación del compuesto potencialmente útil para el tratamiento y/o prevención de dicha patología humana con origen en células stem se puede realizar añadiendo el compuesto a ensayar a un medio de cultivo celular, durante un periodo de tiempo apropiado, a distintas concentraciones, y evaluar
35 la respuesta celular al compuesto a lo largo del tiempo utilizando los ensayos bioquímicos y/o histológicos apropiados. En ocasiones puede ser apropiado añadir el compuesto en cuestión al medio de cultivo celular junto con co-factores que potencien la eficacia del compuesto.

La invención también se refiere al empleo de un promotor que dirige la expresión de un gen en células Sca-1+ en
40 la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de una anomalía cromosómica asociada a patología humana que tiene su origen en células stem, por ejemplo, anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, la leucemia linfoblástica aguda de estirpe T, o con la migración de células stem hematopoyéticas o embrionarias (por ejemplo, alteraciones en el receptor c-kit o su ligando).

45 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 describe la generación de ratones transgénicos, mientras que el Ejemplo 2 pone de manifiesto la utilidad de dichos ratones transgénicos Como modelos para el estudio *in vivo* de patologías humanas con origen en células stem. Para ello, se han seleccionado las translocaciones cromosómicas características que conducen a las fusiones génicas
50 que codifican para proteínas quiméricas asociadas con leucemias humanas (véase el Ejemplo 2). La expresión alterada de dichas fusiones génicas ha sido implicada en un subgrupo característico de leucemias humanas. Se han introducido transgenes conteniendo dichas fusiones génicas en genomas de ratón en los que la expresión de dichos transgenes es dirigida de forma satisfactoria por el promotor pLy-6E.1 de ratón en células Sca-1⁺. La consecuencia sobre-expresión de dichos productos génicos da como resultado la mayoría de los síntomas de las leucemias humanas estudiadas en cada caso, incluyendo la presencia de blastos (en su caso) y un bloque concordante en el programa de diferenciación.
55 No se han encontrado tumores de otros tejidos en los ratones transgénicos, lo que conduce a la conclusión de que la sobre expresión de dichos transgenes es un determinante clave de las leucemias humanas estudiadas, proporcionándose de este modo el primer modelo murino que mimetiza *in vivo* la patología humana con la que están asociadas las fusiones génicas estudiadas. Estos resultados ponen de manifiesto que los ratones transgénicos proporcionados
60 por esta invención constituyen un nuevo modelo para estudiar *in vivo* la biología de los transgenes estudiados e indican la eficacia de esta estrategia para estudiar el papel de anomalías cromosómicas específicas en el desarrollo de tumores.

65 Ejemplos

Los Materiales y Métodos utilizados en los Ejemplos que se describen a continuación fueron los siguientes.

ES 2 311 636 T3

Material

Promotor: Se utilizó el promotor pLy - 6E.1 para dirigir la expresión específica de tejido de los diferentes transgenes (ADNc) en ratones C57BL/6 x CBA (Jackson Laboratory). Este promotor está bien caracterizado y el fragmento de 16 kilobases (kb) utilizado contiene todos los elementos necesarios para la expresión selectiva en células Sca-1⁺ [Miles C, Sanchez M-J, Sinclair A, and Dzierzak, E (1997). "Expression of the Ly - 6E.1 (Sca - 1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo"; Development 124, 537-547].

Genes: Los genes utilizados han sido los siguientes:

BCR-ABL^{p210} humano, fusión génica que se produce como consecuencia de la t (9;22) (q34;q11) y se asocia a leucemia mieloide crónica; los pacientes que presentan esta anomalía cromosómica desarrollan con el tiempo una crisis blástica, que es un fenómeno evolutivo característico de dicha enfermedad;

BCR-ABL^{p190} humano, un oncogén generado por la translocación cromosómica t (9;22) y asociado a leucemia linfoblástica aguda de estirpe B;

Slug murino, un gen que participa en la movilización de células stem hematopoyéticas;

Snail murino, un gen de la familia Slug que participa en la migración de células stem embrionarias;

HOX11 humano, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T;

RHOM2/LMO-2 humano, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T; y

TAL1 murino, un gen activado por anomalías cromosómicas asociadas a leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T.

Los genes activables identificados como BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, HOX11, RHOM2/LMO2 y TAL1 se describen en Annu. Rev. Genet. (1997) 31:429-453; el gen Slug se describe en Science (1994) 264:835-849; y el gen Snail se describe en Developmental Biology (1998)198:277-285; Development (1998)125:3111-3121; y Gene (2000) 257:1-12.

Ratones: Los ratones utilizados son C57BL/6 x CBA y las madres nodriza son CD1; estos animales se pueden adquirir comercialmente, por ejemplo, en The Jackson Laboratory (EEUU).

Métodos

Generación y selección (screening) de ratones transgénicos

Los diferentes ADNc (BCR-ABL^{p190} humano, BCR-ABL^{p210} humano, Slug murino, Snail murino, HOX11 humano, LMO2/RHOM2 humano y TAL1 murino) fueron clonados en el sitio ClaI del promotor pLy-6E.1 de ratón. Los distintos ADNc se obtuvieron mediante digestión con las endonucleasas de restricción apropiadas y cada ADNc se clonó en el vector que contenía el promotor pLy-6E.1 digerido con ClaI mediante técnicas convencionales [Molecular Cloning, third edition, CSHL Press by Sambrook and Russell, 2001].

Para la generación de los ratones transgénicos Sca-1⁺BCR-ABL^{p210}, Sca-1⁺BCR-ABL^{p190}, Sca-1+Slug, Sca-1+Snail y Sca-1+RHOM2/LMO-2 se obtuvo un fragmento de ADN lineal para microinyección mediante digestión con NotI, mientras que para la generación de los ratones transgénicos Sca-1 +HOX11 y Sca-1+TAL1 el fragmento de ADN lineal para microinyección se obtuvo mediante digestión con BamHI. Los diferentes fragmentos de ADN lineal fueron microinyectados en oocitos fecundados de ratones C57BL/6J x CBA. Los ratones transgénicos fundadores fueron identificados mediante análisis Southern blot utilizando sondas específicas que reconocían dichos ADNc, en muestras de ADN extraídas de las colas de los ratones.

La preparación de los oocitos fecundados, la microinyección de las construcciones de ADN conteniendo el promotor y el gen activable operativamente enlazados, la reimplantación de los oocitos fecundados a los que se les habían inyectado dichas construcciones de ADN en las madres nodrizas pseudopreñadas y el mantenimiento de las madres nodriza durante la gestación se realizó mediante el empleo de técnicas convencionales [Hogan, Constantini & Lacy (1986), "Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1986)]. Los porcentajes de (i) oocitos fecundados que fueron transformados correctamente y (ii) embriones que llegaron a término y dieron lugar a ratones transgénicos fueron similares a los descritos en Hogan, Constantini & Lacy (1986), citado *supra*.

La progenie/descendencia de los ratones transgénicos se obtuvo cruzando el ratón fundador con ratones C57BL/6 x CBA e identificando los positivos mediante análisis Southern blot con sondas específicas que reconocían los cDNAs.

ES 2 311 636 T3

Análisis del fenotipo

Para la tinción para citometría se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados a fluoresceína (PE) (todos ellos de Pharmingen): CD45R/B220, Thy-1.1 y Thy-1.2, marcadores mieloides (Mac1/CD11b y Gr-1) y Sig. Suspensiones de células procedentes de muestras de sangre completa obtenidas por técnicas rutinarias fueron incubadas con CD32/CD16 antiratón (Pharmingen) purificado para bloquear la unión a los receptores vía Fc y con una dilución apropiada de los diferentes anticuerpos a temperatura ambiente o a 4°C, respectivamente. Los eritrocitos fueron lisados utilizando solución de tisis (Becton Dickinson). Las muestras se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) y se resuspendieron en PBS. Las células muertas presentes en las muestras fueron excluidas mediante tinción con yoduro de propidio. Las muestras y los datos se analizaron en un FACScan utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson).

Análisis PCR

Se obtuvo ARNm de diferentes tejidos de ratón quimérico. Mediante transcripción en reverso de cada preparación de ARN tratada con DNasa I (HT) de RNasa se obtuvo ADNc. El ADNc se sometió a PCR utilizando unos iniciadores específicos en cada caso [el iniciador directo (5') correspondía a las primeras 20 bases del ADNc y el iniciador inverso (3') era complementario a las últimas 20 bases del ADNc]. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del suministrador de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) bajo las siguientes condiciones: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C durante 25 ciclos con una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Análisis histológico

Las muestras de tejidos se fijaron en formaldehído al 4% en PBS y se embebieron en parafina. Se cortaron láminas delgadas que se procesaron y tiñeron con hematoxilina-eosina mediante técnicas rutinarias. Las láminas fueron examinadas y fotografiadas.

Análisis Western blot

Suspensiones de células procedentes de bazo fueron analizadas por técnicas de inmunoblotting mediante métodos convencionales [Antibodies: A Laboratory Manual. Harlow and Lane. CSH, 1988].

Reagrupamiento inmunoglobulina/gen TCR

Se preparó ADN procedente de diversos tejidos mediante técnicas convencionales. El ADN se digirió con BamHI y los Southern blots se analizaron con una sonda de una inmunoglobulina específica [Blood (rapid publication) 90:2168-2174 (1997)].

Transferencias celulares

Células procedentes de órganos de ratones donantes fueron suspendidas, lavadas e inyectadas por vía intravenosa en la cola de ratones receptores (NOD/SCID) (The Jackson Laboratory) de 4-6 meses de edad. Los ratones se monitorizaron una vez a la semana y fueron sacrificados para estudios histopatológicos y recogida de tejidos para análisis de ADN cuando se encontraban moribundos.

Ejemplo 1

Generación de ratones transgénicos

1.1 Generación de ratones transgénicos Sca1+BCR-ABL^{p210}

Para examinar las consecuencias directas de la expresión del producto del gen BCR-ABL^{p210} (fusión génica que se produce como consecuencia de la t(9;22)(q34;q11) y se asocia a leucemia mieloide crónica) *in vivo* el ADNc de la proteína quimérica humana BCR-ABL^{p210} se clonó bajo el control del promotor pLy-6E.1 de ratón y se inyectó en oocitos fecundados de ratones C57BL/6J x CBA siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado relativo a los "Métodos". Se obtuvieron 2 ratones fundadores transgénicos (Sca-1⁺BCR-ABL^{p210}) que demostraron su capacidad de transmitir el transgén por la línea de células germinales. La expresión del transgén se observó en ambas líneas y la progenie se multiplicó hasta el nivel F7 (Generación 7). La expresión del transgén se demostró mediante PCR y/o análisis Western blot. Ambas líneas celulares mostraron una expresión preferencial en células Sca-1⁺. La expresión del transgén se detectó tanto en ratones macho como en ratones hembra, encontrándose hallazgos similares en ambas líneas de los ratones transgénicos Sca 1+BCR-ABL^{p210}.

1.2 Generación de otros ratones transgénicos

Para examinar las consecuencias directas de la expresión de los productos de los genes BCR-ABL^{p190} humano, Slug murino, Snail murino, HOX11 humano, RHOM2/LMO-2 humano y TAL1 murino *in vivo* los ADNc correspondientes se clonaron bajo el control del promotor pLy6E.1 de ratón y las construcciones resultantes, previamente linearizadas,

ES 2 311 636 T3

se inyectaron en oocitos fecundados de ratones C57BL/6J x CBA siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado relativo a los "Métodos". Se obtuvieron 2 fundadores transgénicos por cada construcción que demostraron su capacidad de transmitir el transgén por la línea de células germinales. Procediendo de esta manera se obtuvieron los ratones transgénicos identificados como:

5 **Sca-1+BCR-ABL^{p190}** desarrollan leucemia linfoblástica aguda de estirpe B) [véase la Figura 3];

Sca-1+Slug (producen migración de células stem hematopoyéticas pero no leucemias);

10 **Sca-1+Snail** (producen migración de células stem embrionarias pero no leucemias);

Sca-1+HOX11 (desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T);

Sca-1+RHOM2/LMO-2 (desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T); y

15 **Sca-1+TAL1** (desarrollan leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T).

En todos los casos la expresión del transgén se observó en ambas líneas y la progenie se multiplicó hasta el nivel F7 (Generación 7). La expresión del transgén se demostró mediante PCR y/o análisis Western blot. Ambas líneas celulares mostraron una expresión preferencial en células Sca-1⁺. La expresión del transgén se detectó tanto en ratones macho como en ratones hembra, encontrándose hallazgos similares en ambas líneas de los ratones transgénicos.

Ejemplo 2

25 *Producción de leucemias en ratones transgénicos*

Aunque en patología humana los productos quiméricos de los genes BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, Sca-1+HOX11, Sca-1+RHOM2/LMO-2 y Sca-1+TAL1, están asociados con distintos tipos de leucemia, concretamente, leucemia mieloida crónica (BCR-ABL^{p210}, leucemia linfoblástica aguda de estirpe B (BCR-ABL^{p190}) y leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T (HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1), los modelos murinos actuales para dichas leucemias han fracasado a la hora de reproducir de forma consistente dichas patologías [Annu. Rev. Genetics (1997) 31:429-453; Current Genomics (2000), 1:71-80] debido a la dificultad de elegir un promotor para manipular la expresión en el tipo celular apropiado.

35 El análisis detallado de las células leucémicas de los distintos ratones transgénicos ensayados (Sca-1+BCR-ABL^{p210} (Figuras 1 y 2) Sca1+BCR-ABL^{p190} (Figura 3), Sca-1+HOX11, Sca-1+RHOM2/LMO-2 y Sca-1+TAL1) permitió establecer la diagnosis de las leucemias correspondientes. La tinción con hematoxilina/eosina puso de manifiesto que las células leucémicas tenían una morfología linfoide/mieloide. La mayoría de las células mononucleares de la sangre periférica tenía un fenotipo compatible con las leucemias correspondientes.

45 Para ensayar la tumorigenicidad de las células de los ratones transgénicos ensayados, 1 x 10⁶ células fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones NOD/SCID normales no irradiados. Todos los ratones inyectados desarrollaron progresivamente leucemias dentro de las 6-11 semanas posteriores al transplante. Por el contrario, ninguno de los 20 ratones inyectados con células de 10 ratones de control desarrollaron una leucemia cuyo origen fuera atribuido al donante. Las células transplantadas desarrollaron la misma clase de leucemia. Además, el origen de los clones leucémicos de los ratones donantes fue confirmado por medio de un análisis PCR revelando la presencia de los transgenes correspondientes.

50 De forma más concreta, en cada caso, los ratones transgénicos machos y hembras mostraron, de forma uniforme, los mismos síntomas (de la patología correspondiente) comenzando a las 8 semanas de edad y aumentando los signos clínicos a lo largo del tiempo hasta la muerte del 100% de los ratones, lo que tuvo lugar a los 12-16 meses de edad. Los ratones fundadores transgénicos eran machos y hembras y desarrollaron los síntomas clínicos propios de la enfermedad correspondiente, de forma similar a la de los otros ratones transgénicos. Todos los ratones transgénicos murieron a causa de los tumores a los 14-18 meses de edad. El porcentaje de supervivencia en las líneas de los 2 ratones fundadores fue similar en cada caso. No se observaron tumores en grupos control constituidos por un número igual de ratones de una camada no transgénicos. A menudo los animales sufrieron taquipnea por lo que fueron sacrificados. Al realizar la autopsia se observó que los animales habían desarrollado unas masas palpables (propias de cada patología) que implicaban tejido hematopoyético que, tras disección, revelaron unos órganos con un tamaño de 5 a 100 veces superior al de los órganos normales. La infiltración del tumor en tejidos no hematopoyéticos era visible y se confirmó microscópicamente. Este examen es consistente con la enfermedad de tejido hematopoyético. Sin embargo, no se observaron tumores de otros tejidos en estos ratones transgénicos. El análisis histológico de estos animales reveló una infiltración marcada de células leucémicas de tejidos hematopoyéticos (bazo y médula) y no hematopoyético (hígado, pulmón, testículos, etc.).

65 Por tanto, los modelos murinos estudiados no solo Asemejan el reagrupamiento que tiene lugar en las leucemias humanas consideradas [leucemia mieloida crónica, leucemia linfoblástica aguda de estirpe B y leucemias linfoblásticas agudas de estirpe T] sino que también reproducen el mismo fenotipo con el que las fusiones génicas implicadas

ES 2 311 636 T3

están asociadas en patologías humanas. Estos resultados validan estos modelos murinos como modelos ideales para el estudio *in vivo* de la biología de los transgenes ensayados (BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, Sca-1+HOX11, Sca-1+RHOM2/LMO-2 y Sca-1+TAL1).

- 5 En su conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la generación de nuevos modelos de ratón en los que la expresión de los correspondientes oncogenes es dirigida por los elementos reguladores del control de la expresión del promotor pLy-6E.1 de ratón, recapitulando las consecuencias de la anomalía cromosómica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 636 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un ratón transgénico que contiene en su genoma una construcción de ADN que contiene un gen que se selecciona de BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, Slug, Snail, HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1, o se crea y/o activa por medio de una anomalía cromosomal asociada con leucemia linfoblástica severa de célula B o leucemia linfoblástica severa de célula T, estando dicho gen bajo control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺.

10 2. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicho gen se selecciona de BCR-ABL^{p210} humano, BCR-ABL^{p190} humano, Slug murino, Snail murino, HOX11 humano, RHOM2/LMO-2 humano y TAL1 humano.

15 3. Un ratón de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el cual dicho promotor es el promotor ratón pLy-6E.1 o un fragmento funcional del mismo.

20 4. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 3, el cual se selecciona de entre los ratones identificados como Sca-1⁺ BCR-ABL^{p210}, Sca-1⁺, BCR-ABL^{p190}, Sca-1⁺ Slug, Sca-1⁺ Snail, Sca-1⁺ HOX11, Sca-1⁺ RHOM2/LMO-2 y Sca-1⁺ TAL1.

25 5. La progenie de un ratón transgénico de acuerdo con las reivindicaciones precedentes.

30 6. Una línea celular de un ratón transgénico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4.

35 7. Un procedimiento para la preparación de un ratón transgénico de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que comprende:

40 i) introducir una construcción de ADN en un oocito fertilizado de un mamífero no humano transgénico, donde dicha construcción de ADN comprende un gen que se selecciona de BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, Slug, Snail, HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1, o se crea y/o activa por medio de una anomalía cromosomal asociada con leucemia linfoblástica severa de célula B o leucemia linfoblástica severa de célula T, estando dicho gen bajo control de un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células Sca-1⁺.

45 ii) implantar dicho oocito fertilizado en una madre nodriza pseudo-embarazada para producir descendientes; y

50 iii) analizar dichos descendientes para evaluar la existencia de genes de la reivindicación 1.

55 8. Uso de un promotor que dirige la expresión de gen en células Sca-1⁺ para la generación de un ratón que presenta una anomalía cromosomal asociada con leucemia linfoblástica severa de célula B o leucemia linfoblástica severa de célula T o donde dicho gen en dicho ratón se selecciona de BCR-ABL^{p210}, BCR-ABL^{p190}, Slug, Snail, HOX11, RHOM2/LMO-2 y TAL1.

60 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicho promotor que dirige la expresión de un gen en células Sca-1⁺ es el promotor ratón pLy-6E.1.

65 10. Uso de un ratón transgénico o su progenie de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, o una línea celular de acuerdo con la reivindicación 6, para evaluación de componentes potencialmente útiles para tratar y/o prevenir una anomalía cromosomal asociada con patología humana neoplástica de origen celular con raíz hematopoyética o no-hematopoyética.

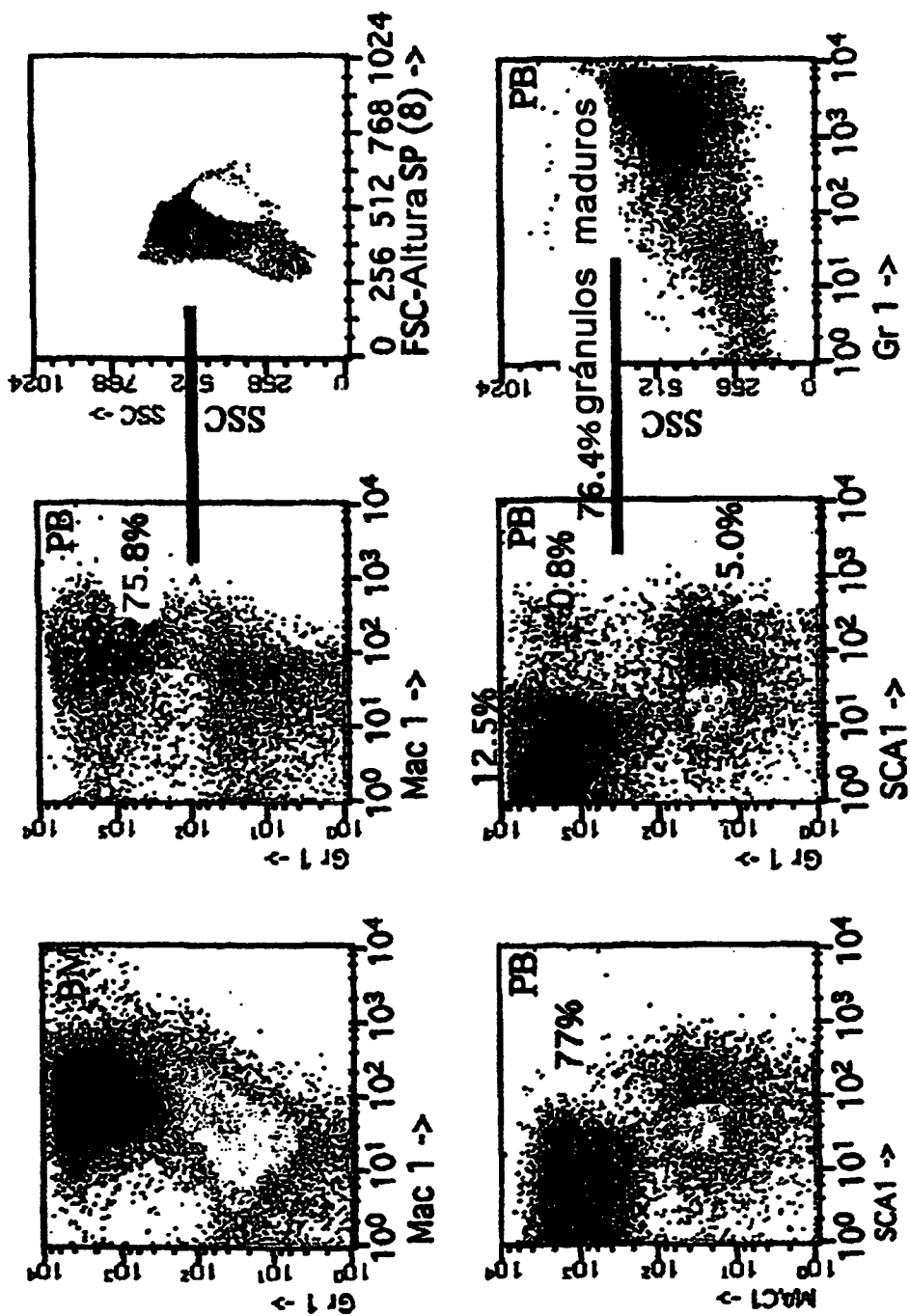


Figura 1A

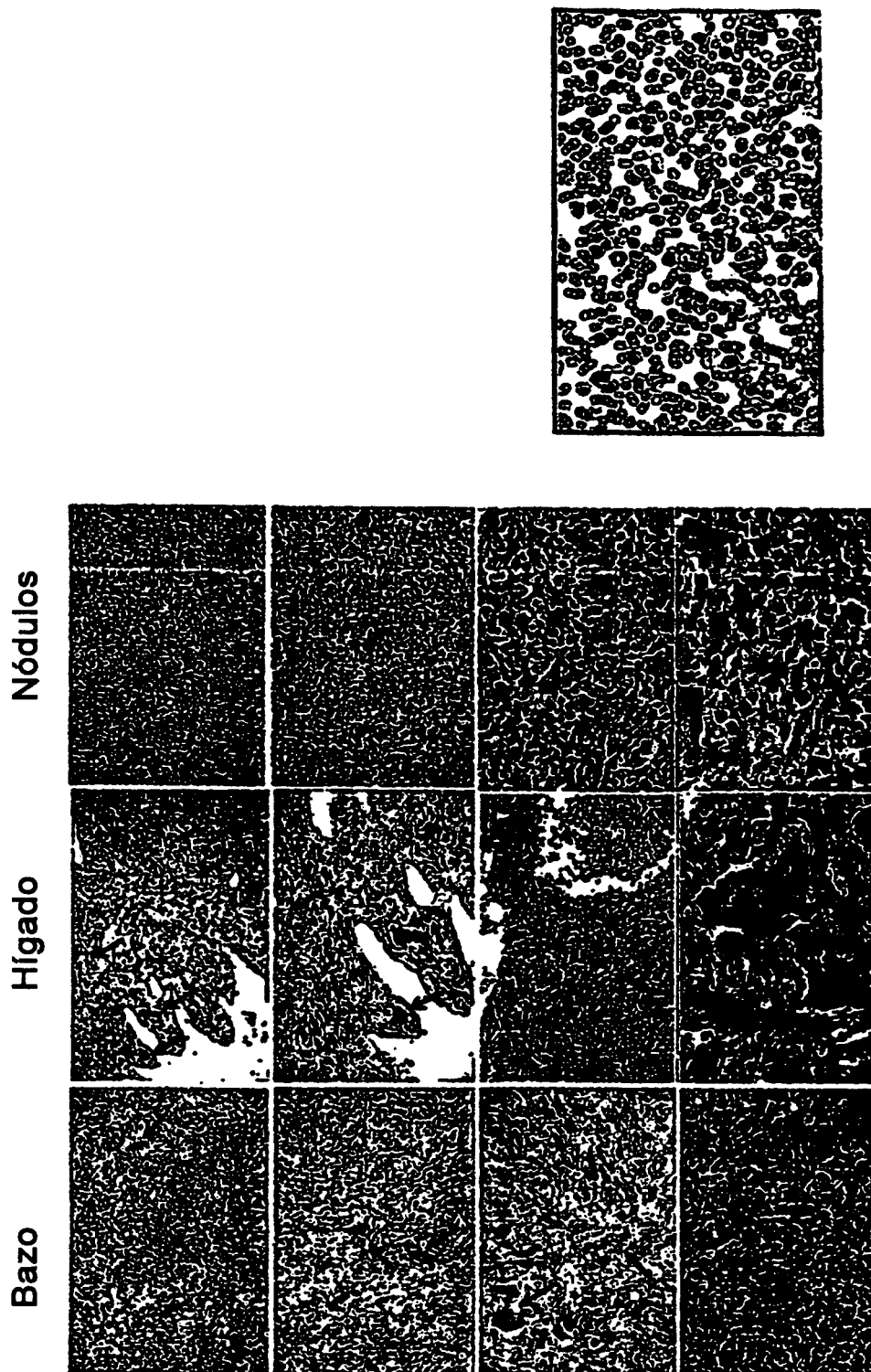


Figura 1C

Figura 1B

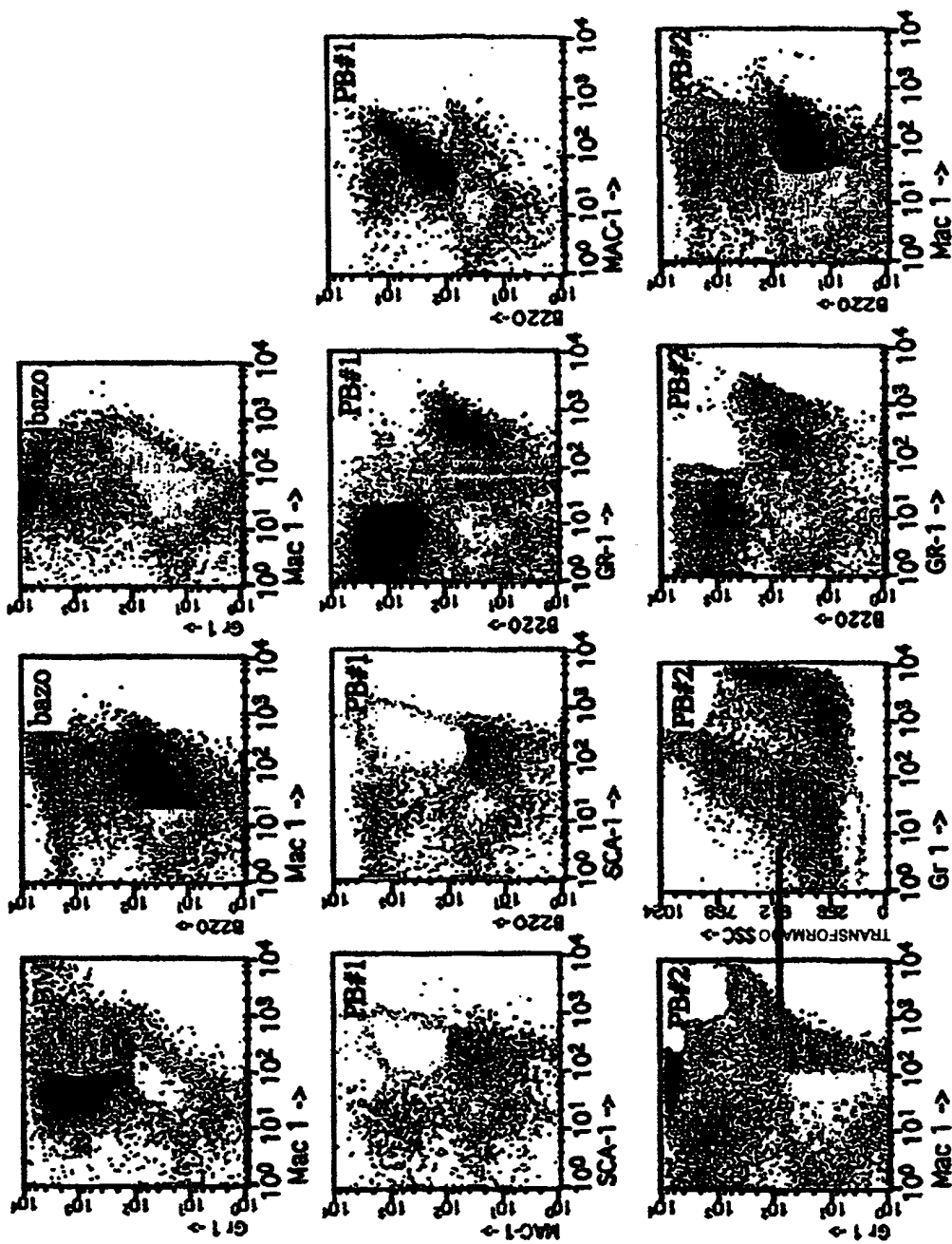


Figura 2A

Hígado

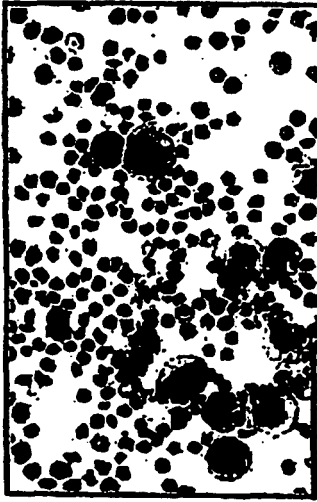
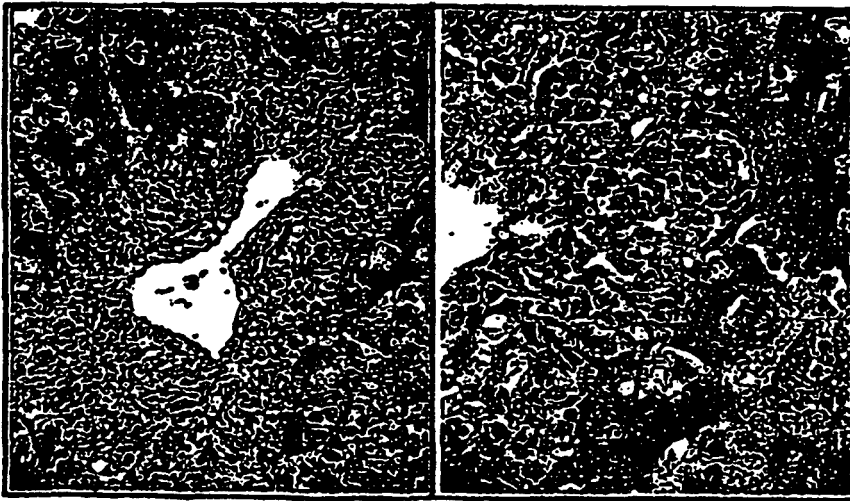


Figura 2C

Figura 2B

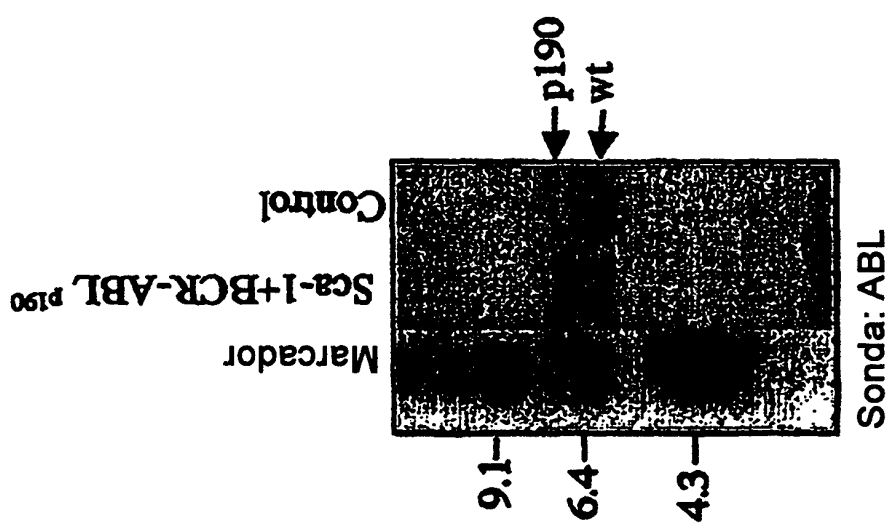


Figura 3A

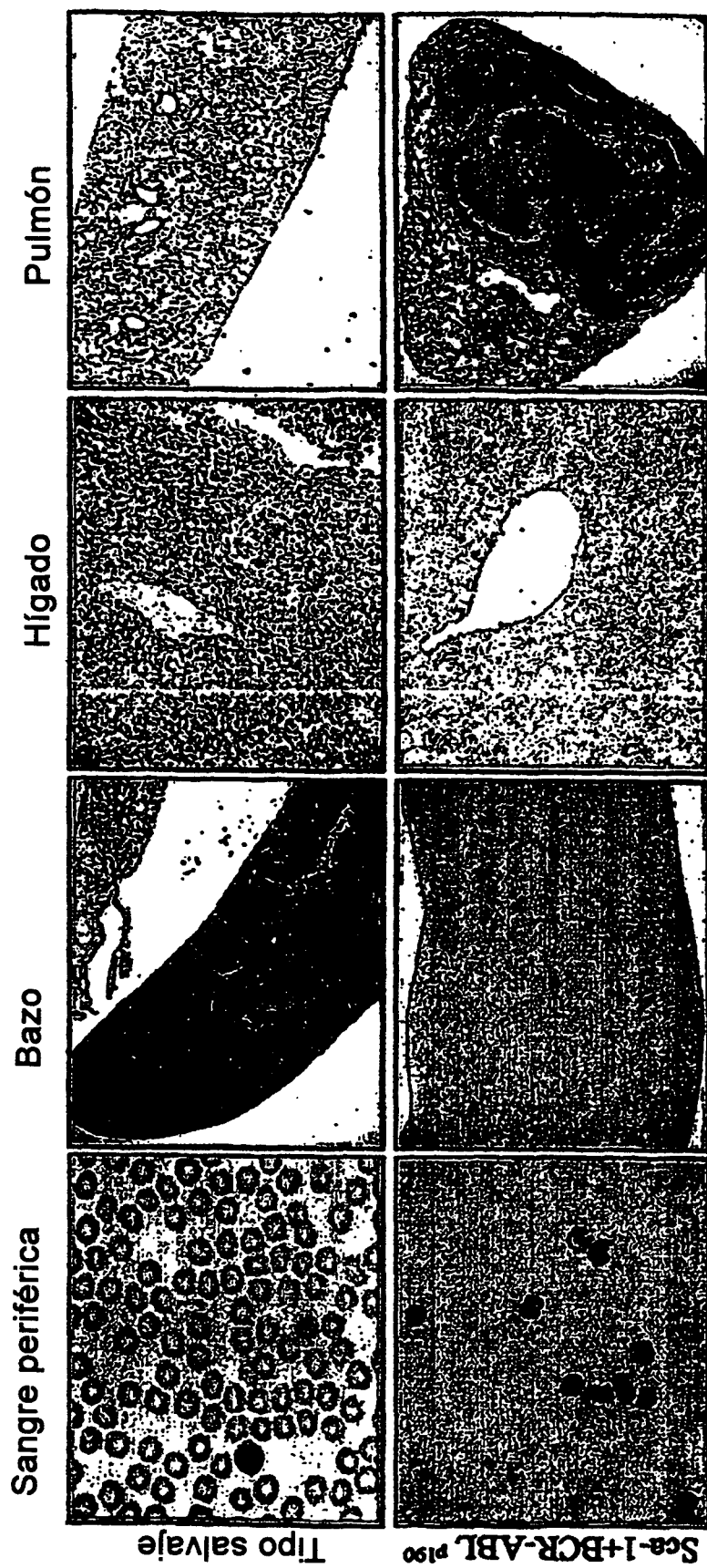


Figura 3B

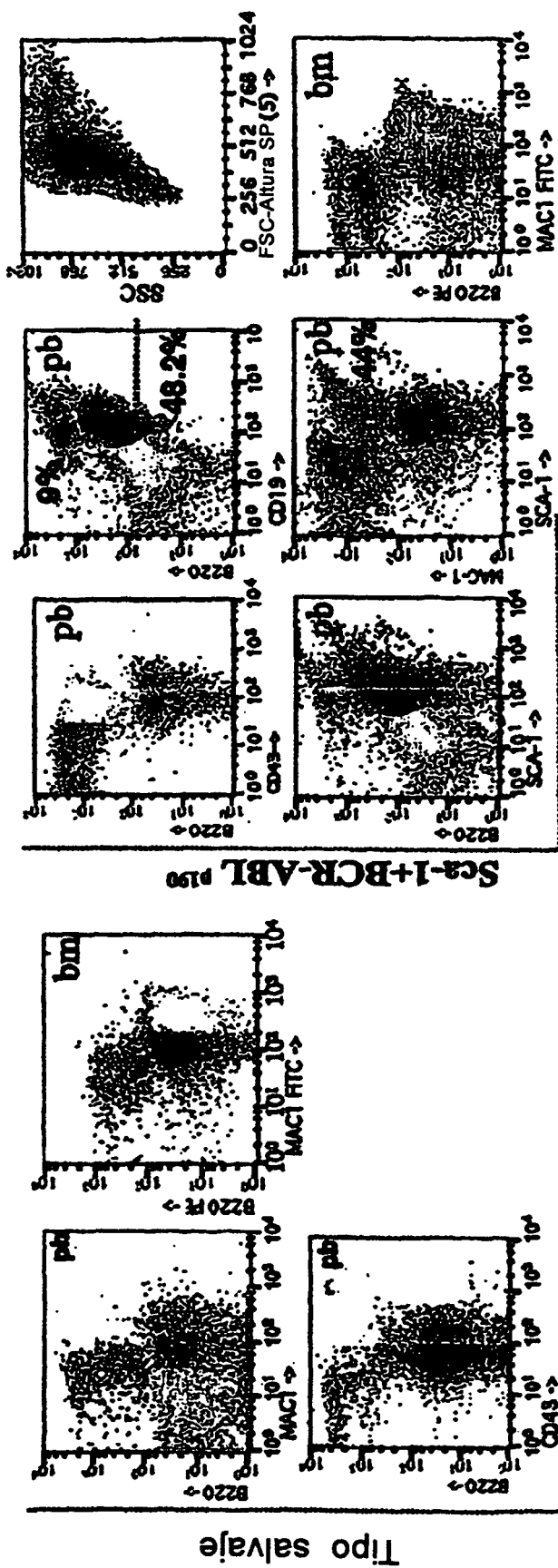


Figura 3C