



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 961**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04787459 .9**

96 Fecha de presentación : **27.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1670309**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54

Título: **Animales transgénicos que presentan trastornos serios asociados a la enfermedad de Alzheimer.**

30

Prioridad: **02.10.2003 FR 03 11578**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2010

73

Titular/es: **AVENTIS PHARMA S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72

Inventor/es: **Blanchard-Bregeon, Veronique;**
Pradier, Laurent;
Itier, Jean-Michel;
Benoit, Patrick;
Tremp, Gunter y
Casas Louzao, Caty

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 961 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).

La presente solicitud se refiere a los animales transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer (AD). Además tiene por objeto la utilización de estos animales.

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a una gran proporción de la población de edad avanzada. Esta enfermedad se caracteriza en el plano clínico por una pérdida de la memoria y un declive de las funciones cognitivas, y en el plano neuropatológico por una pérdida neuronal pronunciada y la presencia en el cerebro de depósitos neurofibrilares intracelulares y depósitos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) que forma placas amiloides.

Las placas amiloides están compuestas mayoritariamente por los péptidos $A\beta$ con 40 ó 42 restos que son generados en el proceso proteolítico del precursor del péptido $A\beta$ (APP). Los depósitos extracelulares de $A\beta$ son muy específicos de los trastornos asociados con la enfermedad de Alzheimer. Representan la característica precoz e invariable de todas las formas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo las formas familiares (FAD). Las formas familiares aparecen de manera relativamente precoz (entre los 30 y 60 años) y son debidas a mutaciones en el gen del APP en el 5% de los casos de FAD con ocho mutaciones antisentido simples o dobles identificadas, en el gen de la presenilina 1 (PS1) en 50 a 70% de los casos de FAD con más de 100 mutaciones diferentes identificadas hasta ahora, y en el gen de la presenilina 2 en los casos más raros de FAD con dos mutaciones antisentido descritas. Se ha mostrado que las mutaciones en estos tres genes inducen cambios en la proteólisis del APP, que llevan a una sobreproducción de $A\beta$, especialmente de la forma larga $A\beta_{42}$, y a la aparición precoz de la patología y síntomas similares a los de las formas esporádicas de la enfermedad de Alzheimer.

Los modelos animales destinados a representar ciertas características de la patología de la enfermedad de Alzheimer ya han sido descritos en la bibliografía.

Se trata por una parte de ratones transgénicos que llevan mutaciones en el gen APP. Desarrollan patologías similares a la enfermedad de Alzheimer a partir de un año. Así el ratón PDAPP, que sobreexpresa el APP humano y que lleva la mutación V717F, desarrolla con la edad depósitos de $A\beta$ en el cerebro pero no presenta pérdida neuronal más allá del emplazamiento de las propias placas (Irizarry et al., 1997, J. Neurosc. 17(18): 7053-7059). Este fenómeno se denomina aquí « efecto placa ».

Igualmente, el ratón Tg(HuAPP695. K670N-M671L)2576, que expresa la isoforma humana APP K670N-M671L (APPSw para la mutación tipo Swedish), presenta depósitos de tipo amiloide pero no presenta pérdida neuronal (Irizarry et al.,

1997, J. Neuropathol. Exp. Neurol 56: 695-973).

En un estudio de Calhoun et al. (1998, Nature 395 : 755-756), se ha mostrado una pérdida neuronal en ciertas regiones cerebrales en la proximidad de las placas amiloides, en los ratones transgénicos APP23 de 14-18 meses de edad que expresan una isoforma mutada de APP humano. Esta observación es controvertida puesto que la pérdida es débil y se produce en los animales relativamente viejos y sobre todo en la proximidad de las placas, lo que podría corresponder al « efecto placa » observado precedentemente. Además, dicha observación no se menciona o se menciona apenas en un comentario reciente que señala que los modelos animales actuales no presentan una completa similitud con todas las características conocidas de las patologías de la enfermedad de Alzheimer, entre otras la pérdida neuronal (Trojanowski, 2002, Am. J. Pathol.160: 409-411).

Por otra parte, se conocen ratones transgénicos que llevan mutaciones en el gen PS1. Estos no parecen desarrollar una patología tipo enfermedad de Alzheimer pero presentan una cantidad elevada de péptido A β 42 (aumento de 2 veces en relación con las PS1 salvajes) que es reconocida como altamente patógena.

Además, en los modelos animales transgénicos descritos que llevan mutaciones FAD P264L o M146L en el gen PS1 de ratón (« knock-in »), la proteína PS1 mutada no se expresa de forma estable (Siman et al., 2000, J. Neurosci., 20: 8717-8726; Flood et al., 2002, Neurobiol. Aging 23 : 335-348; Rozmahel et al., 2002, 23 :187-194). Estos ratones presentan también una cantidad elevada de péptido A β 42.

La solicitud WO 02/0008407 describe dichos ratones transgénicos en los que el gen que codifica la presenilina 1 se ha mutado por introducción de una mutación P264L.

Huang et al. (Exp.Neurol., vol. 183, No2, Oct 2003, p 673-681) describe ratones transgénicos, aparentemente heterocigotos que expresan la proteína PS 1 humana con la mutación L235P.

Un vínculo posible entre las mutaciones respectivas M233T y L235P de PS1 y las formas precoces de la enfermedad de Alzheimer se evoca por la bibliografía (Kwok et al., Neuroreport 14 abril 1997, vol 8, No 6, p1537-1542, y Campion et al., Neuroreport 1996 UK, vol 7, No 10, 1996, p1582-1584).

Debido al papel de la proteína PS1 en la formación de las formas A β 42, se han fabricado también ratones dobles transgénicos que llevan mutaciones en los genes APP y PS1. Como los simples transgénicos descritos antes, estos ratones presentan depósitos de A β pero no presentan pérdida neuronal (Takeuchi et al., 2000, Am. J.

Pathol. 157: 331-339).

Así, los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer que existen no son satisfactorios porque fallan en reproducir una pérdida neuronal que sin embargo es una característica importante de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer.

La solicitante se refiere por tanto a la fabricación de animales que presentan las características importantes de la enfermedad de Alzheimer, entre ellas la pérdida neuronal.

Ha mostrado que es posible obtener dichos animales introduciendo mutaciones específicas en el gen que codifica la proteína PS1 en ratones y cruzando estos ratones con ratones que sobreexpresan el gen humano del APP.

Un primer aspecto de la invención se refiere por tanto a un animal no humano que presenta, ventajosamente en su genoma, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica la presenilina 1 que lleva las dos mutaciones que corresponden a las mutaciones M233T y L235P sobre la proteína PS1 de ratón, en estado homocigoto.

De forma preferente, la proteína PS1 que lleva las mutaciones M233T y L235P es de origen murino.

De manera particularmente preferida la proteína presenilina 1 mutada es endógena.

Así un animal según la presente invención produce ventajosamente una proteína que comprende la secuencia SEQ ID N°2. Produce preferentemente una proteína que presenta la secuencia SEQ ID N°3. Comprende ventajosamente en su genoma la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N°1 o la secuencia SEQ ID N°8.

Las secuencias SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 y SEQ ID N°8 resultan respectivamente de las mutaciones introducidas en las secuencias salvajes SEQ ID N°4, SEQ ID N°5 y SEQ ID N°9. La secuencia SEQ ID N°5 es la de los restos 229 a 237 de la proteína presenilina 1 salvaje de ratón. La secuencia SEQ ID N°9 es la del exón 7 salvaje del gen del ratón que codifica la proteína presenilina 1, es decir, no mutada.

Ventajosamente, un animal según la presente invención coexpresa el APP, preferentemente el APP humano. Dicho gen puede comprender una o varias mutaciones FAD. Así, las mutaciones en el gen del APP pueden ser una de las diferentes mutaciones descritas hasta ahora en la bibliografía. Las mutaciones en el gen del APP se pueden elegir entre las mutaciones "Swedish" (S), "London" (L) y "Dutch" (D) solas o en combinación.

Estas mutaciones están bien descritas en la bibliografía y se caracterizan de una manera general por las modificaciones siguientes :

Naturaleza y posición	Mutación Swedish	Mutación Dutch	Mutación London
con relación al APP770	K 670 N y M 671 L	E 693 Q y/o A 692 G	V 717 I
con relación al APP751	K 651 N y M 652 L	E 674 Q y/o A 673 G	V 698 I
con relación al APP695	K 595 N y M596L	E 618 Q y/o A 617 G	V 642 I
con relación al péptido A- β (A42)		E 22 Q y/o A 21 G	V 46 I

Están igualmente comprendidas en la mutación London todas las sustituciones que no sean de isoleucina que están situadas en la posición 717 con referencia al APP770, tales como por ejemplo las mutaciones V 717 G y V 717 F.

Se entiende que el APP utilizable en el marco de la invención, puede estar bajo diferentes isoformas y en particular en las formas 695, 751 y 770 o en una forma truncada tal como por ejemplo la isoforma APP99, excluyendo la mutación Swedish para esta última.

De manera ventajosa, dicho animal comprende además, ventajosamente en su genoma, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica todo o una parte del gen que codifica el APP751. De manera ventajosa la proteína APP751 es de origen humano. Presenta preferentemente las mutaciones K670N y M671L (Swedich) y V717I (London).

En el marco de la presente invención, el gen del APP está puesto ventajosamente bajo el control de secuencias que permiten su expresión fuerte en las neuronas y en particular de secuencias promotoras de la transcripción tal como un promotor exógeno. Como secuencias promotoras, se pueden citar muy particularmente el promotor HMG (Gautier et al. (1989), *Nucleic Acids Res* 17: 20, 8389.), así como el promotor PDGF (Sasahara et al. (1991), *Cell* 64, 217-27), el promotor Thy-1 (Luthi et al (1997), *J Neurosci* 17, 4688-99) y el promotor del gen del Prión (Scott et al (1992), *Protein Sci* 1, 986-97).

Según una aplicación particularmente interesante de la invención, el modelo animal comprende el gen del APP que tiene las mutaciones S, D y/o L, puesto bajo el control del promotor Thy1.

Así un animal según la presente invención produce preferentemente una proteína que comprende la secuencia SEQ ID N°7. Puede presentar la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N°6.

De forma preferente, se trata de un ratón transgénico obtenido del cruce entre un ratón transgénico ThyAPP (TG53) que lleva una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína humana APP751SL y un ratón transgénico que lleva una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína PS1 de ratón que tiene las mutaciones M233T y L235P.

Los animales según la presente invención reproducen por primera vez una de las características más importantes de las enfermedades neurodegenerativas, que es la pérdida neuronal de forma precoz.

Por otra parte, presentan las demás características clásicamente descritas de estas patologías. Los animales presentan una deposición acelerada de las placas amiloides claramente visible desde los 2 meses de edad, y de forma marcada a los 6 meses.

Presentan también una relación de las formas A β 42 sobre A β total, A β 42/A β superior a aproximadamente 0,9 y eso desde los 2,5 meses. Una relación de este tipo es muy elevada en relación con la descrita en la bibliografía para otros ratones transgénicos.

La pérdida neuronal, ya visible en los ratones de 6 meses de edad, es claramente pronunciada a los 10 meses.

La PKR (Double strand RNA-dependent Protein Kinase) es una quinasa activada por el estrés y que fosforila eIF2, implicado en la apoptosis.

La PKR se detecta en el hipocampo (la estructura en la que tiene lugar la pérdida neuronal) de ratones APPxPS1KI según la invención de 10 meses de edad. No se detecta en el hipocampo de ratones transgénicos APPxPS1M146L de 12 meses de edad en los que por otra parte no se observa ninguna pérdida neuronal.

Las nuevas características de los animales según la presente invención hacen a los modelos de estudio más completos y representativos de los trastornos observados en los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, que los ya descritos. Estos animales están por tanto particularmente adaptados para la identificación de las propiedades neuroprotectoras de los compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, de forma preferente la enfermedad de Alzheimer.

De forma preferente, los animales según la presente invención poseen los alelos mutantes de ps1 en el estado homocigoto y los de APP en el estado heterocigoto. Sin embargo, las mismas características de dicho animal pueden estar descritas en un animal que posee uno de los dos alelos ps1 mutado en el estado

heterocigoto y los de APP en el estado heterocigoto, pero sin embargo con un fenotipo menos marcado o que aparece más tardíamente.

Otra ventaja de los animales según la presente invención es que la tasa de proteína PS1 mutada expresada por este ratón transgénico es equivalente a la tasa de proteína PS1 endógena normalmente expresada por un ratón normal (no transgénico), que expresa una PS1 no mutada. Esta característica hace al mismo un modelo de estudio ventajoso -sin sobreexpresión de la proteína PS1- para la identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Estos compuestos pueden ser, principalmente, compuestos que tienen una acción sobre la regulación del gen PS1 a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional, post-traduccional, o sobre la propia proteína PS1 modificando o regulando una o varias de sus propiedades, o teniendo una acción semejante sobre los copartícipes de interacción o las dianas de la proteína PS1, o también compuestos que tienen una acción sobre la regulación del APP y de forma más amplia todas las moléculas hacia abajo de las señales iniciadas por PS1 y APP a lo largo del proceso neurodegenerativo.

En el marco de la presente invención, los animales son ventajosamente mamíferos tales como los roedores. En particular, se puede tratar de ratones, ratas o conejos.

Los ratones y las construcciones que permiten su obtención se obtienen por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden obtener según las técnicas clásicas de transgénesis. Como ejemplo que ilustra uno de los procedimientos de transgénesis, se puede citar el método de electroporación de una construcción génica que contiene los genes modificados en las células madre embrionarias de ratón y, después de la selección, transferencia de las células portadoras del suceso genético deseado en un blastocito receptor, tal como se describe en los ejemplos. A este respecto, los animales PS1 mutados según la invención se obtienen por electroporación de un casete de expresión que comprende un ácido nucleico. De manera preferente, este ácido nucleico es un ADN que puede ser un ADN genómico (ADNg) o un ADN complementario (ADNc).

La modificación del genoma puede resultar de una alteración o una modificación de uno o varios genes por « knock-in ». Esta modificación puede ser debida a la acción de agentes alterantes o mutágenos clásicos o bien se puede efectuar por mutagénesis dirigida. En la presente invención, en lo que se refiere al gen ps1 mutado, se trata preferentemente de una recombinación homóloga con un vector

de reconocimiento génico que lleva el transgén previamente mutado por mutagénesis dirigida tal como se describe en los ejemplos que siguen.

Los animales que expresan la proteína APP mutada se obtienen por microinyección de una construcción génica en el núcleo de un cigoto.

Los animales doble transgénicos se obtienen por cruce de los animales ps1 mutados y de los animales APP mutados.

Los animales según la presente invención pueden ser utilizados ventajosamente para la identificación de propiedades neuroprotectoras de los compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, y preferentemente la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos pueden ser moléculas químicas, moléculas peptídicas o proteicas, anticuerpos, moléculas quiméricas así como ARNs antisentido o ribozimas. Los compuestos identificados se pueden utilizar como medicamentos, como tales o en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable con el fin de obtener una composición farmacéutica. Se puede tratar en particular de disoluciones salinas (fosfato monosódico, disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc., o las mezclas de dichas sales), estériles, isotónicas, o composiciones secas, principalmente liofilizadas, que por adición según los casos de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de disoluciones inyectables. Las inyecciones se pueden realizar por vía estereotáxica, tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc.

Otro objeto de la invención se refiere por tanto a un procedimiento de identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que comprende al menos las etapas siguientes :

- administración del compuesto o de una mezcla de compuestos a ensayar a los animales según la presente invención, y
- observación de la evolución de uno o varios marcadores característicos que reproducen la neuropatología observada en el ser humano.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que comprende al menos las etapas siguientes :

- poner en contacto las células extraídas de los animales según la presente invención con un compuesto o una mezcla de compuestos, y
- medir el efecto o efectos de los compuestos a nivel de las células enteras, en los homogenatos de células o sobre una fracción subcelular.

Otro objeto de la invención se refiere a cualquier producto biológico obtenido de uno de los dos animales de la invención, así como a sus utilizaciones para la identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la enfermedad de Alzheimer. Se entiende principalmente por « producto biológico », células, extractos proteicos, ADN, ARN, o incluso anticuerpos.

Así, la presente invención tiene por objeto las células o líneas celulares obtenidas de un animal tal como se ha descrito antes, en particular las células madre embrionarias.

La presente invención tiene además por objeto una proteína PS1 de ratón que lleva las mutaciones de los aminoácidos M en T, y L en P respectivamente en las posiciones 233 y 235. De manera ventajosa dicha proteína comprende la secuencia SEQ ID N°2. Preferentemente presenta la secuencia SEQ ID N°3.

Otro objeto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica la proteína PS1 de ratón que lleva las mutaciones de los aminoácidos M en T, y L en P respectivamente en las posiciones 233 y 235.

De manera ventajosa, un ácido nucleico de este tipo según la reivindicación, comprende la secuencia SEQ ID N°1 o la secuencia SEQ ID N°8.

La presente invención tiene además por objeto las secuencias complementarias de estos ácidos nucleicos y los vectores que comprenden estos ácidos nucleicos o sus secuencias complementarias.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de estas proteínas para la identificación de las propiedades neuroprotectoras de los compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se ilustra por los ejemplos que siguen, pero sin que se limite a estos únicos ejemplos.

En estos ejemplos, los resultados descritos demuestran la ventaja de los ratones PS1KI y apoyan claramente la utilización preferente del modelo PS1KIxAPP en las estrategias terapéuticas ya que tiene la ventaja de representar las principales características de las enfermedades neurodegenerativas conocidas hasta ahora.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1 A : Representación esquemática de la estructura del gen ps1 murino y de los principales sitios de restricción alrededor del exón 7 salvaje (línea superior) y del vector de reconocimiento génico utilizado (línea del medio). Los cambios de bases nucleotídicas para generar las mutaciones de los codones M233T y L235P mutaciones

en el exón 7 (*) están representados en el cuadro de puntos. El alelo mutado PS1KI que contiene el casete de resistencia a neomicina (Neo) está representado sobre la línea inferior. La posición de la sonda de 230 pb utilizada para la identificación de los recién nacidos también está indicada.

Figura 1 B : Transferencia Southern utilizando la sonda de 230 pb para distinguir los alelos salvajes WT (banda a 9,2 kb), y PS1KI heterocigotos (He, doble banda) y homocigotos (Ho, banda a 7,4 kb) en diferentes ratones.

Figura 1 C : Inmunotransferencia del fragmento C-terminal de PS1 que muestra que los niveles de expresión de la proteína PS1 no se alteran por la presencia de las mutaciones del alelo PS1KI.

Figuras 2 A, 2B y 2C : Cuantificación, respectivamente, del A β total del A β 42 y de la relación A β total/A β 42, a los 2,5, 4, 6 y 10 meses de edad.

Figura 3 : Aceleración del proceso de deposición del péptido A β en los ratones APP751SLxPS1KI Ho. Plancha ilustrativa de la distribución regional de los depósitos extracelulares del péptido A β en el cerebro a los 6 meses. Las imágenes representan el inmunomarcaje A β (Ac 4G8) en 3 ratones APP751SL (Fig 3A, 3B, 3C) y 3 ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig 3D, 3E, 3F). El inmunomarcaje pone de manifiesto la aparición a los 6 meses de los primeros depósitos todavía escasos en la corteza (Cx) y en el hipocampo (Hp) de los ratones APP751SL. Comparativamente, en los ratones APP751SLxPS1KI Ho de la misma edad, el número de depósitos está ampliamente aumentado en estas regiones. Es de observar que, en estos ratones, los depósitos están ya presentes en cantidad notable en el tálamo (T).

Figura 4 : Progresión con la edad de los procesos de deposición del péptido A β . Plancha ilustrativa de la distribución regional de los depósitos A β en el cerebro a los 10 meses. Las imágenes corresponden a 2 ratones APP751SL (Fig 4A, 4B) y 2 ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig. 4C, 4D). En los ratones APP751SL, el inmunomarcaje pone de manifiesto un aumento importante del número y del tamaño de los depósitos en la corteza (Cx) y el hipocampo (Hp) a los 10 meses en comparación con los 6 meses de edad y la aparición de los primeros depósitos en el tálamo (véase la figura 3). La densidad y el tamaño de los depósitos son igualmente más importantes a los 10 meses en la corteza, en el hipocampo y en el tálamo de los ratones APP751SLxPS1KI Ho. Es de observar que, en estos ratones, se pueden detectar depósitos en pequeño número en el cuerpo estriado (St).

Figura 5 : Proceso de muerte neuronal en CA1 en los ratones APP751SLxPS1KI Ho. Plancha ilustrativa de la afectación de las neuronas piramidales

en el hipocampo de ratones APP751SLxPS1KI Ho de 10 meses de edad. Las imágenes representan la coloración por violeta de Cresilo, con débil aumento en el hipocampo, en 2 ratones PS1KI Ho (Fig. 5A, 5B), 2 ratones APP751SL (Fig. 5C, 5D) y 2 ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig. 5E, 5F). La densidad y espesor de las capas de las células piramidales en el hipocampo son cualitativamente comparables en los ratones APP751SL y los ratones PS1KI Ho de 10 meses. En cambio, a la misma edad, están netamente disminuidos en los ratones APP751SL x PS1KI Ho, en particular en la capa 1 del Asta de Amón (CA1). Es de observar que el número de pequeñas células coloreadas de azul (células de tipo glial) aparece aumentado en el hipocampo de los ratones APP751SL x PS1KI Ho.

Figura 6 : Proceso de muerte neuronal en CA1 en los ratones APP751SLxPS1KI Ho. Plancha ilustrativa de la afectación neuronal en CA1 a los 10 meses por medio de la utilización de otros marcadores neuronales, el verde de metilo y el inmunomarcaje BIP. Las imágenes representan la coloración por verde de metilo, con fuerte aumento en CA1, en un ratón no transgénico (Fig 6A), un ratón PS1KI Ho (Fig 6B), un ratón APP751SL (Fig 6C) y un ratón APP751SLxPS1KI Ho (Fig 6D). Representan el inmunomarcaje BIP con fuerte aumento en CA1, en un ratón PS1KI Ho (Fig 6 E) y un ratón APP751SLxPS1KI Ho (Fig 6F). Comparativamente en los ratones no transgénicos, PS1 KI Ho y APP751SL, el número de células neuronales coloreadas con verde de metilo está netamente disminuido en la región CA1 del ratón APP751SLxPS1KI Ho. Es de observar la detección de células tipo glial coloreadas en número importante en el parénquima del hipocampo de este ratón doble transgénico. El inmunomarcaje BIP confirma igualmente la pérdida de neuronas piramidales importante en CA1 en el ratón APP751SLxPS1KI Ho de 10 meses de edad.

Figura 7 : Muerte neuronal en CA1 y deposición intracelular del péptido A β . Plancha ilustrativa de los dos procesos patológicos, la afectación neuronal y la acumulación intracerebral anormal del péptido A β a los 10 meses. Las imágenes representan, con fuerte aumento en CA1, el inmunomarcaje A β en 2 ratones APP751 (Fig. 7A, 7B) y 2 ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig 7E, 7F). Representan, con fuerte aumento en CA1, la coloración violeta de Cresilo en los ratones APP751 (Fig. 7C, 7D), los ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig. 7G, 7H) y 2 ratones PS1KI Ho (7I, 7J). A los 10 meses de edad, tanto en los ratones simples APP751SL como en los dobles APP751SL x PS1KI Ho, los depósitos extracelulares de A β se observan mayoritariamente de una y otra parte de la capa de neuronas en CA1. En cambio, en CA1 (caracterizada por una afectación neuronal pronunciada a lo largo de la capa en

los ratones APP751SLxPS1KI Ho, Fig 7C 7D), el inmunomarcaje A β de aspecto granular (que corresponde a la acumulación intraneuronal anormal del péptido A β , véanse las flechas) aparece más intenso en los ratones APP751SL x PS1KI Ho. Esto es verdad también a los 6 meses de edad (véase la Figura 8).

Figura 8 : Introducción precoz del proceso de muerte neuronal en CA1 en los APP751SLxPS1KI Ho. Plancha ilustrativa de la región CA1 del hipocampo a los 6 meses. Las imágenes representan, con fuerte aumento en CA1, el inmunomarcaje A β en 3 ratones APP751 (8A, 8B, 8C) y 3 ratones APP751SLxPS1KI Ho (Fig. 8G, 8H, 8I). Representan la coloración por violeta de Cresilo en los ratones APP751 (Fig. 8D, 8E, 8F) y los ratones APP751SLxPS1KI Ho (8J, 8K, 8L). A los 6 meses, la región CA1 del hipocampo, en un ratón APP751SLxPS1KI Ho, se caracteriza por un número de depósitos extracelulares de A β ya importante (Fig 8I), un marcaje granular intracelular de A β intenso (véanse las flechas) y una pérdida de neuronas coloreadas con violeta de Cresilo asociada con un aumento del número de células tipo glial (Fig 8L). Para los otros 2 ratones APP751SLxPS1KI Ho, la capa de neuronas CA1 coloreada con violeta de Cresilo aparece poco (Fig 8J) o nada (Fig 8K) desorganizada. Es de observar que para estos dos ratones, el inmunomarcaje A β intracelular aparece menos intenso y más difuso (Fig 8G, 8H) que en el 3^{er} ratón (Fig 8I).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 : Construcción del vector de reconocimiento génico que lleva las mutaciones M233T y L235P

El objeto ha sido introducir dos mutaciones en el exón 7 del gen PS1 del ratón que conducen a la alteración de los restos M233 en T y L235 en P. Los dos nuevos codones corresponden a las mutaciones identificadas en los pacientes de Alzheimer de comienzo precoz (FAD).

Se ha generado una línea de ratones PS1 *knock-in* (PS1KI) utilizando una estrategia de mutagénesis en 2 etapas similar a la descrita en Kwok et al (1997 Neuroreport 8; 157-42) y Champion et al. (1996, Neuroreport 7, 1582-4).

La estrategia ha pretendido la construcción de un vector de reconocimiento génico portador de cambios de ácidos nucleicos en los codones 233 y 235 del gen murino *ps1* (véase la Fig1A).

Sucintamente, un fragmento genómico de 17 Kb del gen de ratón PS1 ha sido aislado por cribado de un banco de ADN genómico de ratón 129SvJ construido en un bacteriófago lambda (Stratagene, catálogo # 946313). El análisis por digestión con enzimas de restricción, la secuenciación y la comparación con las secuencias

parciales del gen murino PS1 disponibles (Mitsuda et al. 1997, JBC 272, 23489-97), han indicado que este fragmento contenía la región intrón 5 a exón 11 del gen de ratón *PS1*. Un sub-fragmento *BamHI-HindIII* de 9,8 Kb que contiene una parte del intrón 5, el exón 6, el intrón 6, el exón 7 y una parte del intrón 7, ha sido sub-clonado en el plásmido pGEM-11Zf (+) (Promega, Francia) (Fig. 1A). La mutagénesis de los 2 codones se ha realizado utilizando el kit Gene Editor (Promega) sobre el fragmento de ADN que contiene el exón 7 y ha sido confirmada por secuenciación nucleotídica.

El brazo largo (5') del vector de recombinación homólogo se ha obtenido por clonación del fragmento *BamHI-XbaI* de 7 Kb que contiene el exón 6. El brazo corto (3') del mismo ha sido generado por sub-clonación del fragmento *XbaI-EcoRI* de 1,8 Kb que contiene el exón 7 mutagenizado. Se ha introducido un casete de selección positiva (casete pMCI-Neo) en el *sitio XbaI* situado en el intrón 6 en la posición -470 pb en 5' del exón 7 (véase la Fig1A).

Ejemplo 2 : Obtención de células ES que comprenden PS1KI

El vector de reconocimiento génico, descrito en el ejemplo 1, se ha linealizado por digestión con *NotI* y electroporado en la línea de células madre embrionarias (ES) CK35 suministrada por el Dr. Charles Babinet, Institut Pasteur, París, Francia.

Se han cultivado las células como se ha descrito precedentemente (W. Wurtz y A. Joyner, Gene Targeting: A Practical Approach by Alexandra L. Joyner (Editor). Oxford University Press; 2ª edición (15 de Febrero, 2000)).

Se han seleccionado en presencia de G418, 430 clones celulares susceptibles de llevar la recombinación homóloga. El ADN genómico de estos clones se ha analizado por transferencia Southern como se ha descrito precedentemente (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1989) utilizando una sonda PS1 situada fuera del dominio de recombinación (Fig1A) del brazo largo. Se han podido identificar así cuatro clones celulares portadores de las mutaciones deseadas en el gen *PS1*. Estos clones celulares han servido para establecer una línea de ratones transgénicos PS1KI.

Ejemplo 3 : Construcción de la línea de ratones PS1KI

Se ha inyectado el clon 18C5 en los blastocitos de ratón C57B1/6.

Cinco de los ratones quiméricos obtenidos han mostrado una transmisión del alelo mutante *ps1* a la línea germinal (y por tanto a su descendencia).

A partir de estos fundadores, se ha establecido la línea de ratones PS1KI sobre fondo genético puro 129SV y sobre fondo mixto 129SV-C57B1/6.

La presencia del alelo mutado PS1KI en el estado heterocigoto (He) u

homocigoto (Ho) ha sido determinada por transferencias Southern con la sonda *ps1* de 230 pb (Fig.1B). Los ratones mutantes son viables y fértiles.

Ejemplo 4 : Dosificación de PS1 en la línea PS1KI

Después de eutanasia, se ha separado y pesado el cerebro de los ratones. Se ha conservado un hemisferio para la inmunohistoquímica (post-fijación) y el otro ha sido congelado después de ser homogeneizado individualmente sobre hielo con ayuda de un Potter en 2 mL de una disolución tampón: sacarosa 0,32 M, Tris-HCl 4 mM, pH 7,4 que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete™, Roche Diagnostics). La concentración en proteínas ha sido determinada por el método BCA (Pierce). El homogenato se ha conservado a -80 °C.

Para la detección de PS1, se han incubado 25 µg de extracto proteico de cerebro a 56°C durante 20 min en el tampón de depósito Laemmli que contiene urea 8M y ditiotretitol 50 mM. Se han fraccionado las proteínas por electroforesis sobre gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris poliacrilamida (SDS-PAGE) en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico). Después de la transferencia de las proteínas sobre filtro de nitrocelulosa (Amersham, Francia), se ha calentado el filtro en PBS durante 5 min a fin de aumentar la sensibilidad e inmediatamente se ha saturado con 5% (p/V) de leche desnatada en polvo en un tampón PBST (PBS, Tween 20 al 0,05 % (V/V)) durante 1 h y se ha incubado durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario en tampón PBST solo. Se ha detectado la unión del anticuerpo con un anticuerpo -anti IgG (anti-ratón) conjugado con la peroxidasa de Raifort (Amersham, Francia) a la dilución de 1/10.000 en PBST seguido de un sistema de detección por quimioluminiscencia (Amersham, Francia) según las instrucciones del fabricante. Para la detección de PS1, se ha utilizado el anticuerpo primario MAB1563 (Chemicon, EEUU) a la dilución 1/10.000. Para el análisis semi-cuantitativo, las señales de luminiscencia se han digitalizado con una cámara CCD GeneGnome 16 bits (Syngene, Cambridge, Inglaterra) y se han analizado con el programa informático Genetools (Syngene). La linealidad de la señal se ha verificado gracias a curvas estándar establecidas con muestras de 2,5 a 10 µg de homogenato por pista.

Este análisis por inmunotransferencia ha permitido determinar que los niveles de expresión del fragmento C-terminal de PS1 mutada permanecen normales y no han disminuido en el ratón PS1KI233/235 (Fig1C).

Ejemplo 5 : Obtención de la línea PS1KIxAPP por cruce de las líneas PS1KI y APP

Los ratones PS1KI (descritos en los ejemplos 1 a 4) se han cruzado con una

línea de ratones transgénicos que sobreexpresan la forma humana del ADNc APP₇₅₁ que lleva las mutaciones FAD Swedish (mutación K670N; M671L) y London (V717I) bajo el control del promotor Thy-1. Los ratones que sobreexpresan la forma humana del ADNc APP₇₅₁ que lleva las mutaciones han sido obtenidos como se describe en la solicitud de patente WO O1/20977.

En todos los experimentos siguientes, se han utilizado ratones del mismo fondo genético para minimizar cualquier efecto debido a las variaciones de fondo genético.

Ejemplo 6 : Dosificación del péptido amiloide A β total y A β 42 por el método de inmunoquimioluminiscencia

Para la cuantificación de la mezcla global de A β en el cerebro (formas solubles y formas agregadas o insolubles), se han tratado alícuotas de homogenato de cerebro con 2 volúmenes de una disolución 9M de hidrocloreuro de guanidina (GH) en Tris 50 mM pH 7,4. Los homogenatos se han mezclado durante 1h con 3 periodos de sonicación de 15 min seguidos de una centrifugación a 50.000 g a 4°C durante 2h. Los extractos de guanidina se han diluido 1/20 en tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, BSA al 0,5 % (p/v) y Tween 20 al 0,05 % (p/v). La concentración del péptido A β en las fracciones se ha determinado a continuación por inmunoquimioluminiscencia (Yang et al., 1994, *Biotechnology (NY)* 12(2), 193-194) con ayuda de 2 anticuerpos monoclonales de ratón anti-péptido A β (4G8 y 6E10) y del lector Origen M8 Analyzer (IGEN Europe Inc. Oxford) siguiendo un protocolo modificado según Khorkova et al. (*J. Neurosci. Methods* 82, 159-166 (1998)).

El anticuerpo monoclonal 4G8 (Senetek PLC), que reconoce el epítipo de los restos 17-24 del péptido A β , es marcado con rutenio gracias al éster TAG-NHS siguiendo el protocolo del proveedor (IGEN Europe Inc., Oxford). Ru-4G8 y el anticuerpo biotinilado 6E10, epítipo 1-10 del péptido A β (Senetek PLC) se ponen en presencia de la fracción soluble de cerebro y los complejos tripartitos Ru-4G8/A β /6E10-biot se cuantifican por el lector Origen. Para calibrar cada experimento se utiliza una gama de péptido sintético A β (Bachem). La tasa de péptido A β se calcula en nanogramos por g de peso inicial de tejido cerebral.

Para medir específicamente las formas de péptido A β que se terminan en la posición 42 (A β 42), el anticuerpo 6E10 fue reemplazado por el anticuerpo monoclonal 22F9 que se fija específicamente al extremo C-terminal A β 42 (Wirhth et al., 2002, *Brain Pathol.* 12, 275-286).

En conclusión, la presencia del gen ps1 *knock-in* (PS1-KI) conduce a :

- Una aceleración de la acumulación de A β (Fig2A) y A β 42 (Fig2B) en el

cerebro con un efecto todavía más pronunciado cuando el alelo PS1KI está presente en el estado homocigoto (efecto gen-dosis). El efecto de PS1KI(Ho) es más acentuado que con el ratón transgénico que sobreexpresa PS1M146L precedentemente descrito en la solicitud WO O1/20977.

- Un aumento masivo de la proporción de péptido A β que presenta un extremo β 42, que representa la gran mayoría del A β cuando la mutación PS1KI está en el estado homocigoto, como muestra la figura 2C (relación A β 42/A β total igual a 0,92, a los 2,5 meses de edad, frente a 0,25 en ausencia de PS1KI y un valor intermedio 0,70 en presencia de un solo alelo PS1KI: efecto gen-dosis). Se reconoce en la bibliografía que las especies de péptido A β que se terminan en el extremo β 42 representan las formas más patológicas del péptido. La línea PS1KIxAPP representa por tanto un modelo particularmente enriquecido en formas patológicas.

Ejemplo 7 : Análisis de los depósitos del péptido A β por inmunohistoquímica

Para los experimentos de inmunohistoquímica/histología, después de extracción y postfijación en paraformaldehído al 4 %, los hemisferios se crioprotegen durante 1 noche a 4°C, en tampón fosfato de sodio 0,2 M (NaH₂PO₄·2H₂O / Na₂HPO₄·12H₂O, pH 7,4) que contiene sacarosa al 20% (P/V). A continuación se congelan durante 1 min en isopentano mantenido a una temperatura de -30°C en nieve carbónica. Finalmente, se colocan en un tampón PBS 0,02 M, cortes de 25 μ m de espesor, realizados en un criostato con termostato a -30°C (LEICA CM3000) y después se conservan a 4°C.

Sobre estos cortes, se ha realizado la detección inmunoenzimática del péptido A β gracias al sistema de revelación que implica la formación de complejos avidina-biotina-peroxidasa (ABC) en el cual es biotinilada la peroxidasa de Raifort acoplada a la avidina. Brevemente, después de una incubación de 30 min en el tampón de bloqueo (suero normal de cabra (Chemicon) al 10 % en PBS que contiene 0,1 % de tritón (Sigma), los cortes de cerebros se ponen en presencia de una disolución de H₂O₂ al 0,3 % a fin de eliminar las endoperoxidasas presentes en el tejido. Después se incuban estos cortes en la disolución de anticuerpo primario que contiene 0,3 % de tritón y 2 % de suero normal (toda la noche a 4°C). El anticuerpo primario anti-A β (4G8, Senetek) (anticuerpo monoclonal dirigido contra el resto 17-24 del péptido A β) utilizado es biotinilado. Después de lavados, los cortes se ponen entonces directamente en presencia del complejo ABC, durante 1 hora según las instrucciones del fabricante (Kit ABC Vectastin, Laboratoires Vector, Burlingame, CA). Se ha

utilizado la 3-3'-diaminobencidina como cromógeno para la enzima peroxidasa.

Así, la aceleración de la acumulación anormal del péptido A β en el cerebro de los ratones dobles transgénicos APP751SLxPS1KI Ho, detectada precedentemente por ensayos bioquímicos sobre homogenatos de hemicerebros, ha sido confirmada por inmunohistoquímica. En efecto, el análisis microscópico del inmunomarcaje A β obtenido sobre cortes de hemicerebros ha demostrado la existencia de un proceso de deposición del péptido A β acelerado en el parénquima cerebral de estos ratones. En efecto, mientras que los primeros depósitos aparecen en la corteza y el hipocampo hacia los 6 meses de edad en los ratones APP751SL (Fig. 3), pueden ser detectados desde la edad de 2 meses en los dobles APP751SLxPS1KI en el estado homocigoto. Comparativamente con los simples transgénicos APP751SL, en los dobles transgénicos (APP751SLxPS1KI Ho) de 6 meses de edad, la densidad de los depósitos de A β es netamente más importante en el hipocampo y la corteza. Además, la distribución de los depósitos es más amplia; en particular los depósitos son ya detectados en el tálamo y también en la protuberancia (Fig.3).

Con la edad, en particular a los 10 meses, la densidad e igualmente el tamaño de los depósitos aumentan en el cerebro de los ratones simples transgénicos APP751SL (Fig 4). La distribución de estos depósitos es igualmente más amplia puesto que están presentes en el tálamo. En los dobles transgénicos APP751SLxPS1KI Ho de 10 meses de edad, se observa una progresión similar del proceso de deposición del péptido A β en el hipocampo, la corteza, el tálamo y la protuberancia. Los primeros depósitos pueden ser detectados en número limitado en el cuerpo estriado (Fig. 4). Por el contrario, el cerebelo permanece sin el proceso de deposición de A β . Es de observar que en el cerebro de los ratones PS1KI Ho de 10 meses de edad (n = 4), no se detecta ningún depósito del péptido A β .

Ejemplo 8 : Análisis de la pérdida neuronal por histología e inmunohistoquímica

La presencia de una proporción muy importante de péptido A β 42 patológico, ha llevado a analizar si en la línea APP751SLxPS1KI Ho, además de la aceleración del proceso de deposición del péptido A β , se desarrolla con la edad una pérdida neuronal. Para esto, se han realizado 3 tipos de coloraciones que permiten visualizar la desaparición de células neuronales sobre cortes de tejido cerebral : a) la histología con violeta de cresilo que colorea los cuerpos de Nissl (los orgánulos citoplásmicos asociados a los ribosomas del retículo endoplásmico granuloso) y permite la puesta de manifiesto sobre cortes de cerebro del conjunto de las células neuronales y gliales; b) la histología con verde de metilo que colorea el ADN de todas las células; c) la

inmunohistoquímica con BIP que revela la expresión en las células de una proteína chaperona residente del retículo endoplásmico.

Para la coloración con violeta de cresilo, los cortes de tejido cerebral se montan sobre láminas gelatinadas y después se incuban durante 10 minutos en una disolución de violeta de cresilo (C 1791, Sigma) al 0,5 % en agua destilada. Después de un lavado en medio ácido, finalmente se deshidratan los cortes.

Para la coloración con verde de metilo, los cortes se montan sobre láminas gelatinadas y después se incuban durante 10 minutos en una disolución de verde de metilo (M5015 de sigma) al 1 % en agua destilada, se lavan y después se deshidratan.

Para la inmunohistoquímica con BIP (anticuerpo policlonal, SPA-826, Stressgen), el protocolo es idéntico al aplicado para la inmunohistoquímica del péptido A β (véase anteriormente) excepto la incubación suplementaria (1h, a temperatura ambiente) de los cortes en una disolución de anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en la cabra, Vector) antes de su incubación en el complejo ABC.

El análisis microscópico ha puesto de manifiesto, mediante la utilización de diferentes marcadores histológicos/inmunohistoquímica, una disminución del espesor de la capa de las células piramidales del hipocampo, en particular de CA1, en el cerebro de los ratones APP751SLxPS1KI Ho (n = 3/3) (Figuras 5 y 6). Esta disminución indica la existencia de un proceso de muerte neuronal ya bien instalado a la edad de 10 meses. A los 6 meses, la muerte neuronal se presenta en el cerebro de 1/3 de los ratones lo que sugiere la introducción precoz de un proceso neurotóxico (Figura 8). El análisis en paralelo en el hipocampo, y en particular en CA1, de los 2 procesos patológicos que son la acumulación anormal del péptido A β en el cerebro y la afectación neuronal, sugiere un papel más probable en el proceso neurotóxico de la acumulación intracelular de A β (fenómeno ya descrito en los ratones thy1APP751SLxPS1 M146L) que su acumulación en depósitos extracelulares (Figura 7). En efecto, las neuronas todavía presentes en CA1 presentan una expresión anormalmente fuerte del péptido A β . Además, la afectación neuronal en CA1 está claramente presente en las regiones desprovistas de depósitos extracelulares. Es de observar la existencia de un probable efecto gen-dosis en el proceso de muerte neuronal en CA1. Se ha encontrado en efecto una afectación neuronal en los ratones APP751SLxPS1KI muy viejos (> 15 meses) que no tienen más que un alelo PS1KI.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AVENTIS PHARMA S.A.

<120> ANIMALES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN MUTANTES DE PS1 Y APP QUE PRESENTAN LOS TRASTORNOS PRINCIPALES LIGADOS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

<130> PRJ03034

<160> 9

<170> Patente en versión 3.1

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

atcagtgcc tcacggcacc ggtattt

27

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Ile Ser Ala Leu Thr Ala Pro val Phe
1 . 5

<210> 3

<211> 467

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
1 5 10 15
Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn Asp Ser
20 25 30
Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp Asn Pro Glu
35 40 45
Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg Gln Val Val Glu
50 55 60
Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys
65 70 75 80
His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val
85 90 95
Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln
100 105 110
Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg
115 120 125
Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val
130 135 140
Ile Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys
145 150 155 160
Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe
165 170 175
Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala
180 185 190
Val Asp Tyr Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val
195 200 205
Gly Met Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala
210 215 220
Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Thr Ala Pro Val Phe Ile Lys Tyr
225 230 235 240
Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr
245 250 255
Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val
260 265 270
Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe
1 5

<210> 6

<211> 2.265

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

cccgggtcca ccatgctgcc cggtttgca ctgctcctgc tggccgcctg gacggctcgg      60
gcgctggagg taccactga tgtaatgct ggcctgctgg ctgaaccca gattgccatg      120
ttctgtggca gactgaacat gcatatgaat gtccagaatg ggaagtggga ttcagatcca      180
tcagggacca aaacctgcat tgataccaag gaagggcatcc tgcagtattg ccaagaagtc      240
taccctgaac tgcagatcac caatgtggta gaagccaacc aaccagtgac catccagaac      300
tgggtgcaag ggggcccga gcaagtgaag acccatcccc actttgtgat tccctaccgc      360
tgcttagttg gtgagtttgt aagtgatgcc cttctcgttc ctgacaagtg caaattctta      420
caccaggaga ggatggatgt ttgcgaaact catcttact ggcacaccgt cgccaaagag      480
acatgcagtg agaagagtac caacttgcac gactacggca tgttgctgcc ctgcggaatt      540
gacaagtcc gagggtaga gtttgtgtgt tgcccactgg ctgaagaaag tgacaatgtg      600
gattctgctg atgcggagga ggatgactcg gatgtctggt ggggaggagc agacacagac      660
tatgcagatg ggagtgaaga caaagtagta gaagtagcag aggaggaaga agtggctgag      720
gtggaagaag aagaagccga tgatgacgag gacgatgagg atggatgatga ggtagaggaa      780
gaggctgagg aacctacga agaagccaca gagagaacca ccagcattgc caccaccacc      840
accaccacca cagagtctgt ggaagagggt gttcgagagg tgtgctctga acaagccgag      900
acggggccgt gccgagcaat gatctcccgc tggactttg atgtgactga agggaagtgt      960
gccccattct ttacggcgg atgtggcggc aaccggaaca actttgacac agaagagtac     1020
tgcattggccg tgtgtggcag cgccattcct acaacagcag ccagtacccc tgatgccggt     1080
gacaagtatc tcgagacacc tggggatgag aatgaacatg cccatttcca gaaagccaaa     1140
gagaggcttg aggccaagca ccgagagaga atgtcccagg tcatgagaga atgggaagag     1200
gcagaacgtc aagcaaagaa cttgcctaaa gctgataaga aggcagttat ccagcatttc     1260
caggagaaag tggaaatctt ggaacaggaa gcagccaacg agagacagca gctggtggag     1320

```

acacacatgg ccagagtgga agccatgctc aatgaccgcc gccgcctggc cctggagaac 1380
 tacatcaccg ctctgcaggc tgttcctcct cggcctcgtc acgtgttcaa tatgctaaag 1440
 aagtatgtcc gcgcagaaca gaaggacaga cagcacaccc taaagcattt cgagcatgtg 1500
 cgcattggtg atcccaagaa agccgctcag atccgggtccc aggttatgac acacctccgt 1560
 gtgatttatg agcgcattgaa tcagtctctc tccctgctct acaacgtgcc tgcagtggcc 1620
 gaggagattc aggatgaagt tgatgagctg ctccagaaaag agcaaaacta ttcagatgac 1680
 gtcttggtcca acatgattag tgaaccaagg atcagttacg gaaacgatgc tctcatgcca 1740
 tctttgaccg aaacgaaaac caccgtggag ctcttcccgc tgaatggaga gttcagcctg 1800
 gacgatctcc agccgtggca ttcttttggg gctgactctg tgccagccaa cacagaaaac 1860
 gaagttgagc ctgttgatgc ccgccctgct gccgaccgag gactgaccac tcgaccaggt 1920
 tctgggttga caaatatcaa gacggaggag atctctgaag tgaatctgga tgcagaattc 1980
 cgacatgact caggatatga agttcatcat caaaaattgg tgttctttgc agaagatgtg 2040
 ggttcaaaaca aaggtgcaat cattggactc atgggtggcg gtgttgtcat agcgacagtg 2100
 atcatcatca ccttggtgat gctgaagaag aaacagtaca catccattca tcatggtgtg 2160
 gtggaggttg acgccgctgt caccacagag gagcgcacc tgtccaagat gcagcagaac 2220
 ggctacgaaa atccaaccta caagttcttt gagcagatgc agaac 2265

<210> 7

<211> 751

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

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

His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg
 370 375 380

Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln
 385 390 395 400

Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe
 405 410 415

Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln
 420 425 430

Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp
 435 440 445

Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val
 450 455 460

Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg
 465 470 475 480

Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val
 485 490 495

Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met
 500 505 510

Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu
 515 520 525

Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp
 530 535 540

Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn
 545 550 555 560

Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro
 565 570 575

Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly
 580 585 590

Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp
 595 600 605

Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg
 610 615 620

Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr
 625 630 635 640

Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe
645 650 655

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
660 665 670

Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
675 680 685

Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Ile Ile Thr Leu Val Met Leu
690 695 700

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp
705 710 715 720

Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn
725 730 735

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
740 745 750

<210> 8

<211> 221

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 8

```

ggaagtattt aagacctaca atgtcgccgt ggactacggt acagtagcac tcctaactctg      60
gaattttggt gtggtcggga tgattgcat cactggaaa gcccccttc gactgcagca      120
ggcgtatctc attatgatca gtgccctcac ggcaccgta tttatcaagt acctccccga      180
atggaccgca tggctcatct tggctgtgat ttcagtatat g                          221

```

<210> 9

<211> 221

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 9

```
ggaagtattt aagacctaca atgtcgccgt ggactacggt acagtagcac tcctaactctg    60
gaattttggt gtggtcggga tgattgcat cactggaaa ggcccccttc gactgcagca    120
ggcgtatctc attatgatca gtgccctcat ggccctgga tttatcaagt acctccccga    180
atggaccgca tggtcatct tggctgtgat ttcagtatat g                          221
```

REIVINDICACIONES

1. Animal no humano que presenta una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína presenilina 1 que lleva en el estado homocigoto las mutaciones que corresponden a las mutaciones M233T y L235P sobre la proteína PS1 de ratón.
2. Animal según la reivindicación 1 que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica todo o una parte del gen que codifica el APP.
3. Animal según una de las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado porque** expresa una cantidad de PS1 mutada comparable a la cantidad de la PS1 endógena de un animal que expresa una PS1 no mutada.
4. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado porque** la proteína presenilina 1 que lleva las mutaciones M233T y L235P es de origen murino.
5. Animal según una de las reivindicaciones 2 a 4 **caracterizado porque** la proteína APP es la APP751 y es de origen humano.
6. Animal según una de las reivindicaciones 2 a 5 **caracterizado porque** la proteína APP751 es de origen humano y presenta las mutaciones Swedish y London.
7. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado porque** es un roedor.
8. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado porque** es un ratón, una rata o un conejo.
9. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado porque** produce una proteína que comprende la secuencia SEQ ID N°2.
10. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado porque** presenta en su genoma la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N°1.
11. Animal según una de las reivindicaciones 2 a 10 **caracterizado porque** la expresión del gen que codifica el APP está bajo el control de un promotor exógeno.
12. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado porque** presenta una pérdida neuronal.
13. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado porque** presenta una relación Abeta42/Abeta total superior a aproximadamente 0,9.
14. Animal según una de las reivindicaciones 1 a 13 **caracterizado porque** la proteína presenilina 1 mutada es endógena.

15. Célula o línea celular obtenida de un animal según una de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Célula o línea celular que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el gen murino de la presenilina 1 bajo una forma mutada en M233T y L235P.
17. Célula madre embrionaria obtenida de un animal según una de las reivindicaciones 1 a 14.
18. Proteína PS1 de ratón que lleva las mutaciones de los aminoácidos M en T, y L en P respectivamente en las posiciones 233 y 235.
19. Proteína según la reivindicación 18 **caracterizada porque** comprende la secuencia SEQ ID N°2.
20. Ácido nucleico que codifica la proteína PS1 de ratón que lleva las mutaciones de los aminoácidos M en T, y L en P respectivamente en las posiciones 233 y 235.
21. Ácido nucleico según la reivindicación 20 **caracterizado porque** comprende la secuencia SEQ ID N°1.
22. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 21.
23. Utilización de un animal según una de las reivindicaciones 1 a 14, para la identificación de compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
24. Procedimiento de identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que comprende las etapas siguientes :
 - administración del compuesto o de una mezcla de compuestos a ensayar a un animal según una de las reivindicaciones 1 a 14, y
 - observación de la evolución de uno o varios marcadores característicos que reproducen la neuropatología observada en el ser humano.
25. Procedimiento de identificación de compuestos destinados al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que comprende las etapas siguientes :
 - poner en contacto las células extraídas de un animal según una de las reivindicaciones 1 a 14 con un compuesto o una mezcla de compuestos y
 - medir el efecto o efectos de los compuestos a nivel de las células enteras, en los homogenatos de células o sobre una fracción subcelular.
26. Utilización de una proteína según una de las reivindicaciones 18 y 19 para la identificación de compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

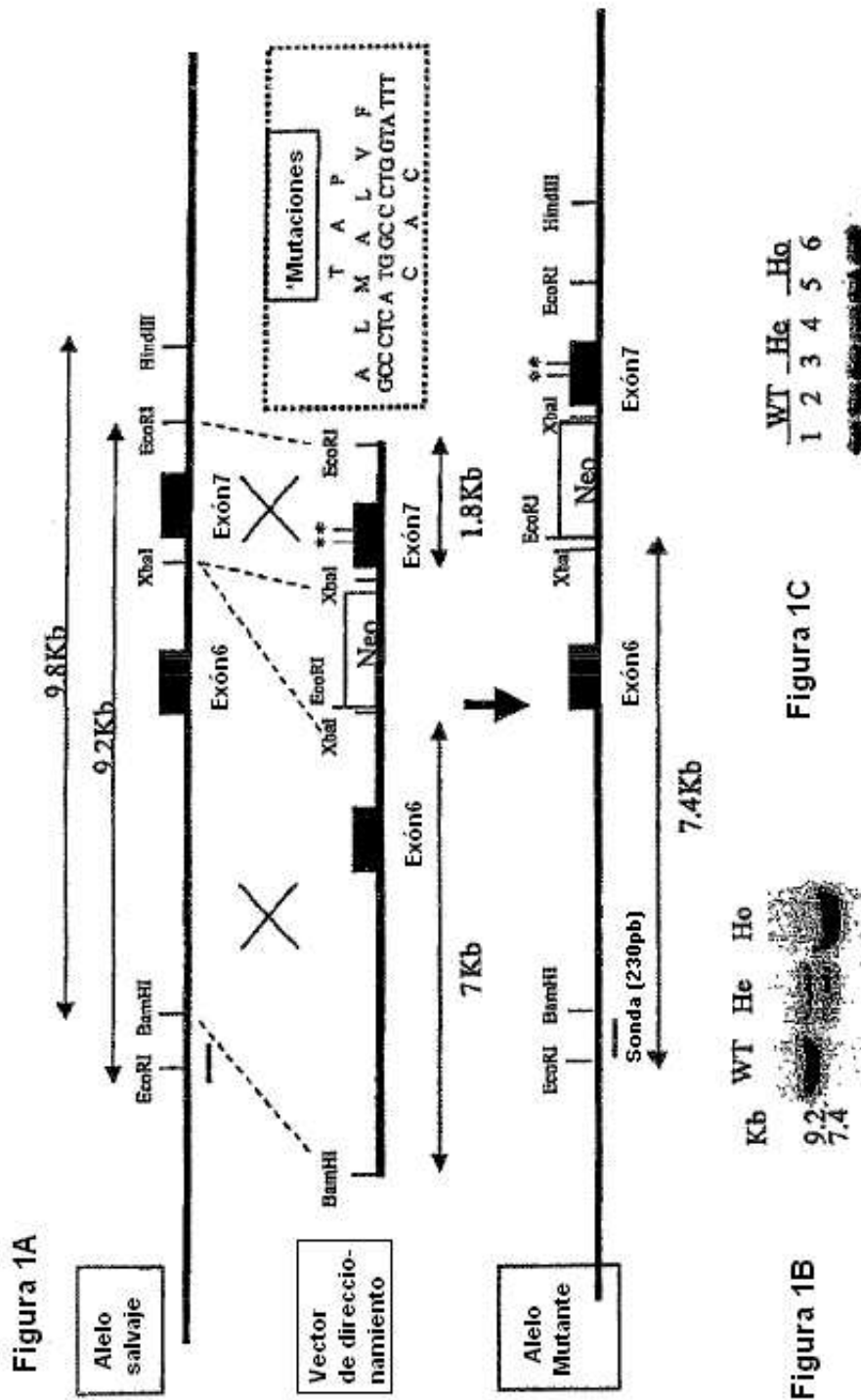


Figura 2A

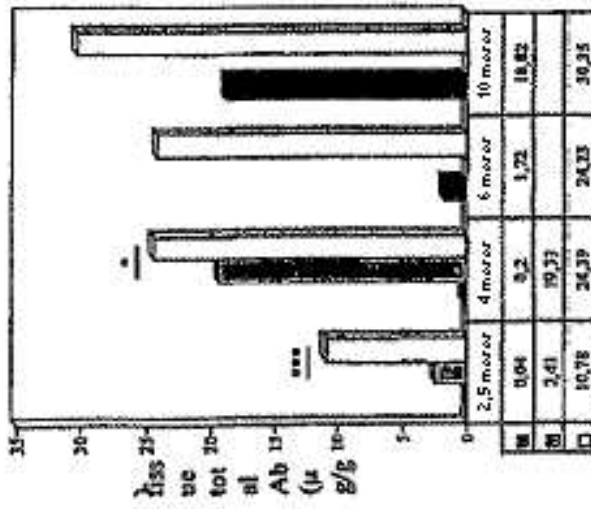


Figura 2B

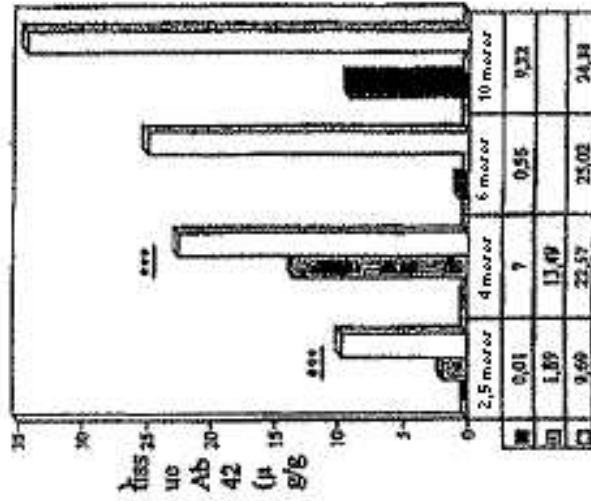
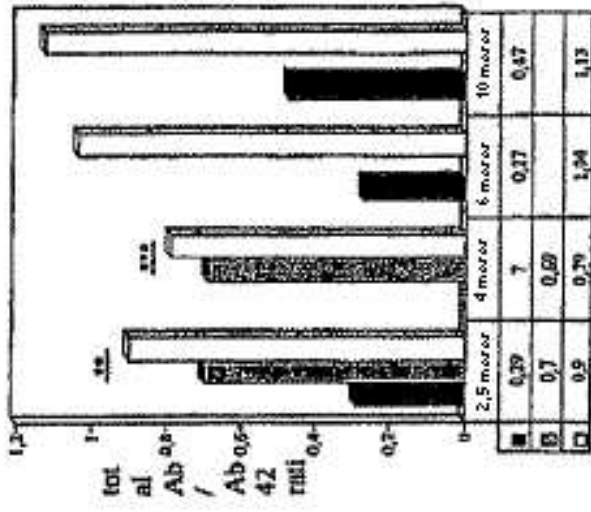


Figura 2C



- Thy-APP751 SL He
- ▨ Thy-APP751 SL He x PSIKI He
- Thy-APP751 SL He x PSIKI Ho

Fig 3A



Fig 3D



Fig 3B



Fig 3E

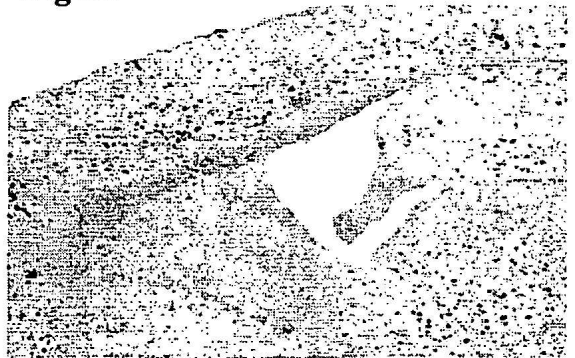


Fig 3C



Fig 3F

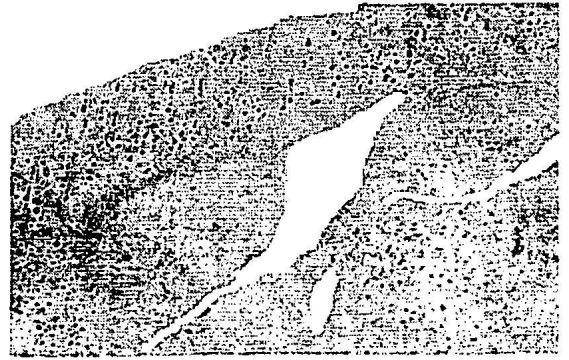


Fig 4A



Fig 4B

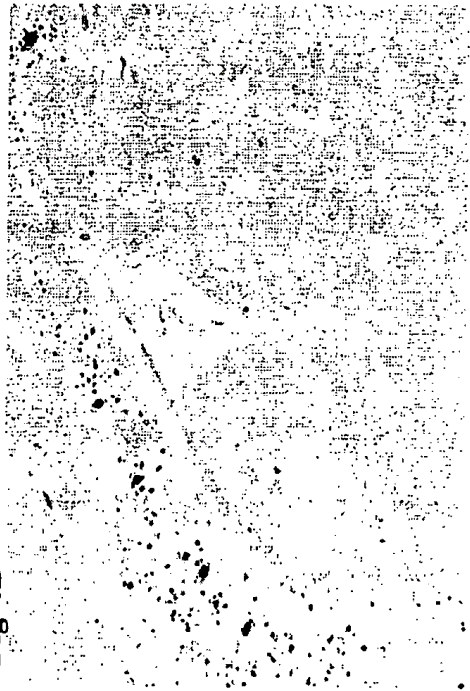


Fig 4C

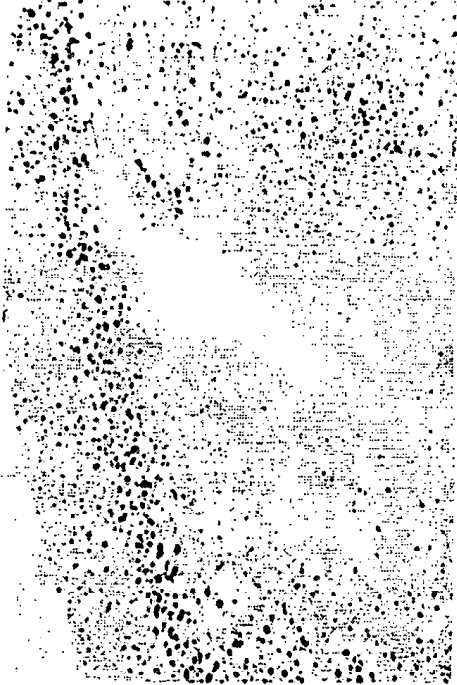


Fig 4D

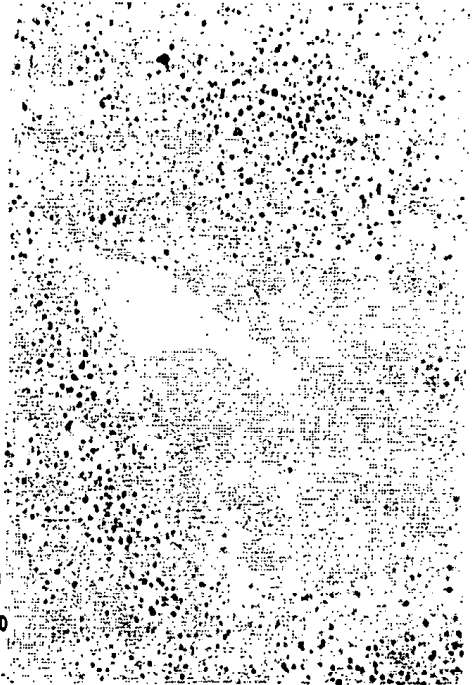


Fig 5A

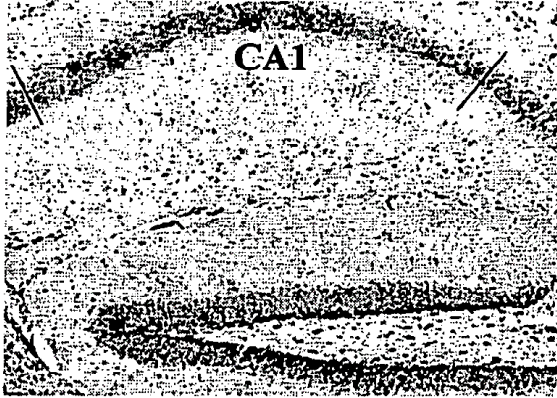


Fig 5B



Fig 5C



Fig 5D



Fig 5E

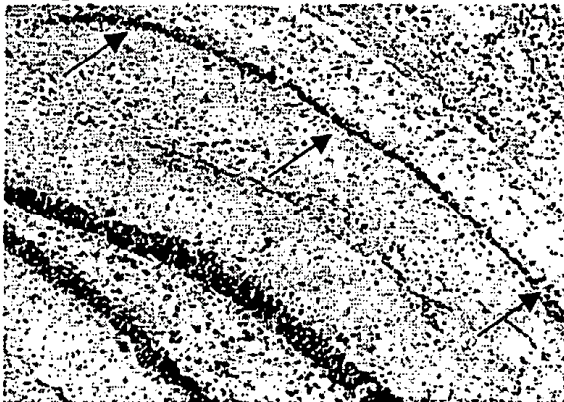
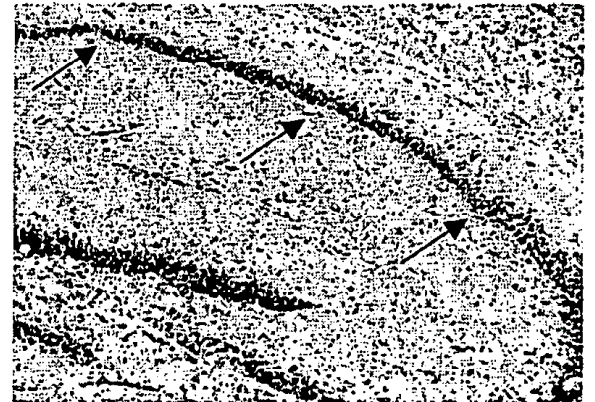


Fig 5F



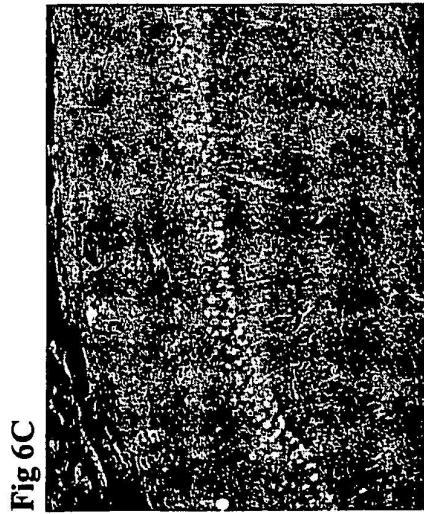
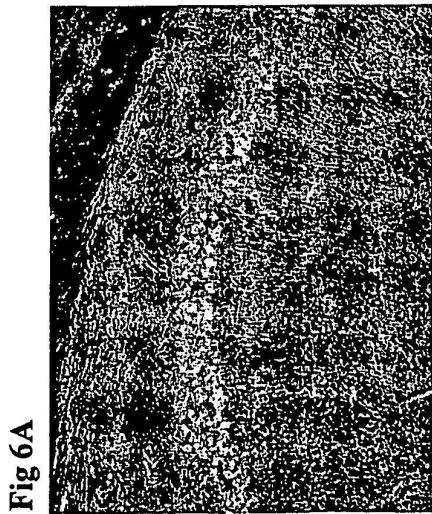
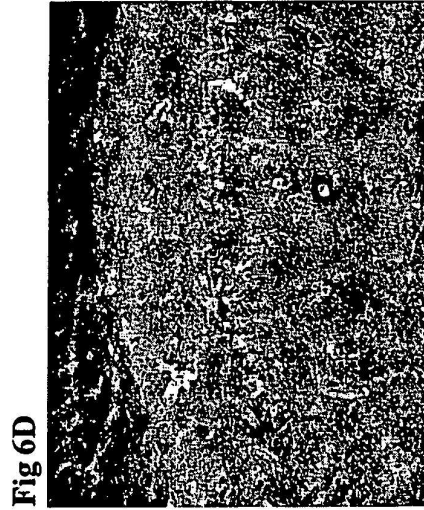
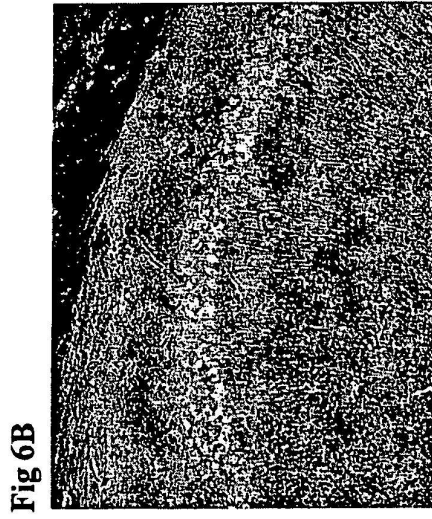
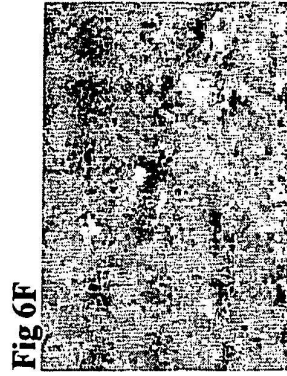
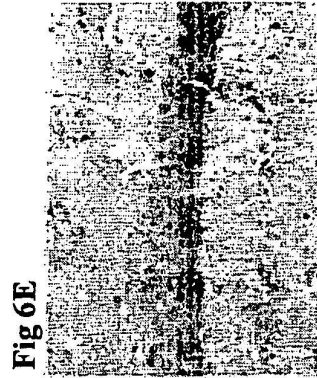


Fig 7A

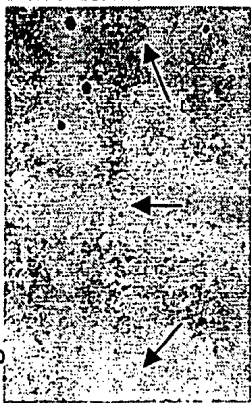


Fig 7C

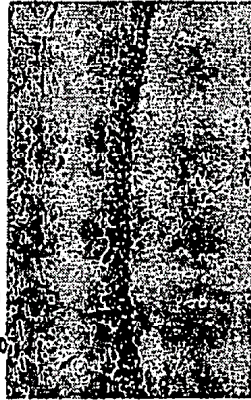


Fig 7E

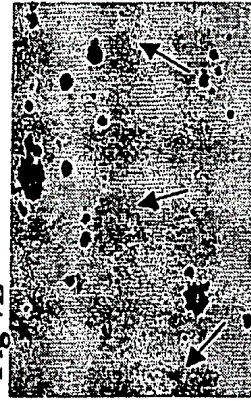


Fig 7G



Fig 7B

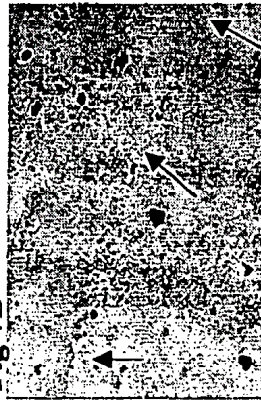


Fig 7D



Fig 7F



Fig 7H



Fig 7I

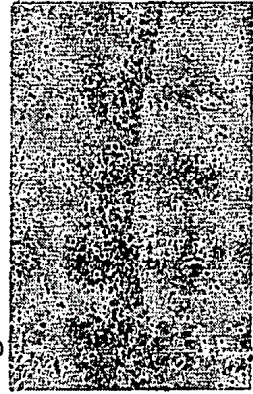


Fig 7J

