



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 300**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97934526 .1**

86 Fecha de presentación : **23.07.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0920495**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.1999**

54

Título: **Modelo animal transgénico para la enfermedad de Alzheimer.**

30

Prioridad: **24.07.1996 GB 9615569**  
**02.06.1997 GB 9711262**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es: **Novartis AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72

Inventor/es: **Sommer, Bernd y**  
**Staufenbiel, Matthias**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 307 300 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

Modelo animal transgénico para la enfermedad de Alzheimer.

5 La presente invención se refiere a un modelo animal útil para someter a prueba posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en particular la enfermedad de Alzheimer (EA).

Más particularmente la invención se refiere a un modelo animal que implica la manipulación transgénica de la proteína precursora de amiloide (APP).

10 La ausencia de un modelo animal experimental para la EA que refleje los mecanismos patológicos es un obstáculo principal tanto para la investigación básica como para el desarrollo farmacológico. Como aproximación a tales modelos, puede intentarse la reproducción de lesiones características tales como placas seniles, patología neurofibrilar y pérdida celular en ciertas zonas del hipocampo y de la corteza cerebral. Sin embargo, en la actualidad no queda claro si estas lesiones son causa o consecuencia del proceso patológico. Un enfoque alternativo para la generación de modelos es usar factores que se sabe que conducen a la enfermedad. Recientemente, estudios genéticos revelaron mutaciones en la APP, que se segrega conjuntamente con la aparición temprana de la EA familiar en la quinta o sexta década de vida y sigue un patrón de herencia autosómica dominante. Tres mutaciones de cambio de sentido distintas afectan al codón 717 de APP (alterando V717→I {a continuación en el presente documento denominada la mutación de Londres}, V717→G y V717→F en el polipéptido), mientras que los codones 670/671 (alterando K670→N y M671→L en el polipéptido, a continuación en el presente documento denominada la mutación sueca) se alteran en el gen de APP de una genealogía de EA sueca (números según APP770). Estas mutaciones flanquean la parte de APP que da lugar a  $\beta$ A4, el componente principal de los filamentos depositados en placas en el cerebro de pacientes con EA. Estudios *in vitro* han indicado que la mutación sueca conduce a un aumento en la formación de una forma soluble de  $\beta$ A4, mientras que las mutaciones de APP717 dan lugar a una mayor proporción de una variante de  $\beta$ A4 mayor lo que facilita la formación de filamentos. Junto con el hallazgo de que el  $\beta$ A4 filamentosos es tóxico *in vitro*, esto sugiere que las mutaciones de APP pueden conducir a la EA por medio de un mecanismo que implica  $\beta$ A4, pero no pueden excluirse otros mecanismos.

30 Más recientemente, se han generado ratones transgénicos, que expresan APP con mutaciones en los codones 717 y 670/671, usando varios promotores específicos de neuronas para dirigir la expresión de ADNc de APP humanos. Aunque se han obtenido niveles de proteína que alcanzan o superan la cantidad de APP endógena, no se ha observado el patrón completo de alteraciones histológicas características de la EA en ratones transgénicos.

35 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que mediante la selección apropiada del constructo de expresión de APP, se obtienen altos niveles de ARNm transgénico, que superan el mensaje de APP endógena en hasta 10 veces, y dan como resultado niveles de proteína elevados en proporción. Además, con el análisis histológico, se observan depósitos significativos del péptido  $\beta$ A4 humano. Adicionalmente e incluso de manera más importante, se consigue la hiperfosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos, lo que es un fenotipo patológico asociado a la EA. Además, los depósitos acumulan tinción de colinesterasa asociada con una distorsión local de las fibras colinérgicas observadas normalmente en la EA. Previamente no se ha informado de estas dos características con animales transgénicos análogos. La patología va acompañada de pérdida de neuronas selectiva en distintas zonas del cerebro.

45 Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un constructo de ADN recombinante que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca, unida de manera funcional a un elemento promotor de Thy-1, caracterizado porque el elemento promotor de Thy-1 es un elemento promotor de Thy-1 de roedor, por ejemplo, de ratón, y la mutación sueca es la única mutación presente en el polipéptido APP.

50 Se ha encontrado que ratones transgénicos que expresan dicha APP humana mutada bajo el control de dicho promotor desarrollan un fenotipo patológico que va más allá de lo descrito anteriormente por Games *et al.* [Nature 373, 523-527 (1995)], combinando características relacionadas con tau y APP y de la patología de la EA. Además, se ha encontrado que los ratones presentan cambios de comportamiento característicos de la EA, de lo que tampoco se había informado nunca antes con animales transgénicos.

55 Se apreciará que tales ratones, al reflejar detenidamente la patología de la EA, así como sus células transgénicas, son modelos particularmente útiles de la enfermedad.

60 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona ratones transgénicos que muestran características relacionadas tanto con tau como con APP, por ejemplo características histológicas, de patología de la EA, y preferiblemente también cambios de comportamiento característicos de la EA.

65 Los ratones transgénicos expresan una APP humana que comprende la mutación sueca. De manera adecuada, el ratón transgénico también muestra las características de la patología de la EA antes de los 12 meses de edad de manera preferible aproximadamente a los 6 meses de edad. Este aspecto de la invención incluye células transgénicas derivadas del ratón transgénico.

## ES 2 307 300 T3

Sin perjuicio para la generalidad de la presente invención, parece que el nivel al que se expresa el transgén en el animal transgénico, por ejemplo, el nivel del ARNm transgénico, es un factor importante para obtener la patología de la EA en el animal.

5 También se da a conocer una célula de ratón transgénico, en la que se expresa ADN que codifica para una APP humana que sólo tiene la mutación sueca a un nivel tal que la cantidad de ARNm transgénico supera el mensaje de APP endógena en aproximadamente 5 veces, por ejemplo desde 3 hasta 6 veces, o más, por ejemplo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 veces, así como un ratón transgénico, en cuyas células se expresa ADN que codifica para una APP humana que sólo tiene la mutación sueca a un nivel tal que la cantidad de ARNm transgénico supera el mensaje endógeno en aproximadamente 5 veces o más.

Además parece que el número de lesiones genéticas que influyen en la producción de  $\beta$ A4 introducidas en un animal transgénico es otro factor importante para obtener la patología de la EA en el animal.

15 El ADN que codifica para la APP humana puede comprender ADNc y/o ADN genómico, y es, convenientemente, ADNc.

Más particularmente, la presente invención proporciona una célula de ratón transgénico, en la que se expresa ADN que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca bajo el control transcripcional de un elemento promotor de Thy-1 de roedor, así como un ratón transgénico, en cuyas células se expresa ADN que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca bajo el control transcripcional de un elemento promotor de Thy-1, caracterizada porque la mutación sueca es la única mutación presente en el polipéptido APP y el elemento promotor de Thy-1 es un elemento promotor de Thy-1 de roedor, por ejemplo de ratón.

25 Los ratones transgénicos según la invención incluyen ratones en los que se ha introducido directamente el constructo así como la prole de tales ratones que conservan la capacidad para expresar el constructo.

Pueden prepararse células manipuladas según la invención mediante cualquier técnica de transfección conocida. Puede introducirse la secuencia de ADN mediante manipulación genética directa o en una generación más temprana de la célula. Por tanto, pueden obtenerse las células a partir de animales transgénicos y pueden cultivarse *in vitro*.

Además, los ratones transgénicos pueden generarse según métodos bien establecidos, tales como manipulación de embriones, por ejemplo mediante transferencia genética en células madre embrionarias, infección retroviral de embriones tempranos o microinyección pronuclear.

35 Se prefiere la técnica de microinyección pronuclear. Se inyectan las unidades de transcripción obtenidas a partir de un constructo de ADN recombinante de la invención en pronúcleos de embriones de ratón y se crían los animales transgénicos fundadores obtenidos.

40 Los resultados obtenidos en la descendencia pueden analizarse usando diversas técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, por ejemplo, se analiza la expresión de ARNm de APP transgénico mediante transferencia del ARN, se determina el patrón de expresión del transgén en el cerebro mediante hibridación *in situ*, se efectúa la detección de APP en el cerebro usando técnicas de inmunotransferencia (análisis de inmunotransferencia de tipo Western) y se estudian los efectos de la expresión mediante histología e inmunohistología.

45 Pueden usarse modelos basados en las células y los animales de la invención, por ejemplo para identificar y evaluar la eficacia de posibles agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas, particularmente en enfermedades en las que se deposita el péptido  $\beta$ A4 y/o se hiperfosforila la proteína tau asociada a microtúbulos, más particularmente en la EA. En particular, pueden usarse tales modelos en ensayos de selección o caracterización para detectar agentes que posiblemente eviten el depósito de  $\beta$ A4 y/o la hiperfosforilación de tau.

50 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención comprende un método para someter a prueba un posible agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que se usa una célula de la invención como célula diana. Más particularmente comprende un método de este tipo, en el que se administra el agente a un ratón transgénico de la invención. Además, la invención comprende un ensayo de selección o caracterización que consiste en, o que incluye, un método de este tipo, así como un kit de ensayo de selección que comprende células de la invención.

60 En la técnica se conocen bien métodos para seleccionar posibles agentes terapéuticos usando líneas celulares o animales. Las células y los animales de la presente invención pueden usarse de manera análoga.

65 Por ejemplo, las células recombinantes pueden incubarse con el posible agente terapéutico y con anticuerpos que reconocen el amiloide  $\beta$ A4 en placas difusas y seniles típicas y/o con anticuerpos frente a tau que tienen los ovillos neurofibrilares en el cerebro con Alzheimer. En métodos en los que se usan los propios ratones transgénicos, pueden determinarse los efectos del posible agente terapéutico llevando a cabo diversas investigaciones en el animal tras el sacrificio. Además, tras la administración del posible agente terapéutico, puede someterse al ratón transgénico a pruebas de comportamiento con el fin de monitorizar la función cognitiva.

## ES 2 307 300 T3

Las técnicas de detección de  $\beta$ A4 y proteína tau, incluyendo análisis de inmunotransferencia de tipo Western, y los anticuerpos usados para las mismas, también están bien documentados.

También son parte de la presente invención compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, que se han identificado usando un ensayo o kit de ensayo tal como se definió anteriormente.

El siguiente ejemplo ilustra la invención:

### Constructo de expresión

Se modifica el ADNc de APP751 humano que porta la mutación doble sueca en el extremo 5' para reconstituir una secuencia de iniciación de la traducción óptima (GCC GCC ATG G).

Este ADNc que empieza en la secuencia anterior y que se extiende hasta el nucleótido 3026 (sitio Hind III) se inserta en el sitio de clonación Xho I de un vector a base de pUC18 que contiene un fragmento de EcoRI de 8,1 kb que comprende el gen Thy-1.2 de ratón [Vidal *et al.* (1990) EMBO J. 9, 833-840]. Se modifica el vector de modo que se sustituye un fragmento de BanI-XhoI de 1,5 kb que porta el exón 3 y las secuencias intercaladas flanqueantes por una secuencia de ligador que codifica para el sitio de reconocimiento Xho I único [Moechars *et al.* (1996) EMBO J. 15, 1265-1274]. Se liberan unidades de transcripción mediante digestión con NotI/PvuI. Se modifica el constructo de expresión APP 14 descrito en K. Andrä *et al.*, *Neurobiology of Aging*, vol. 17, nº 2, 183-190 (1996) sustituyendo un fragmento de Bgl II/Spe I de 600 pb con un fragmento correspondiente de un ADNc de APP<sub>751</sub> humano que porta la mutación de Londres V 717 → I. Se liberan unidades de transcripción mediante digestión con Not I.

### Generación de ratones transgénicos

Se inyectan unidades de transcripción aisladas en los pronúcleos de embriones de B6D2F1 x B6D2F1 para generar animales fundadores transgénicos.

Análisis de transferencia tipo Northern, hibridación *in situ*, análisis de inmunotransferencia tipo Western, histología e inmunohistología

Se realizan según los métodos descritos en K. Andrä *et al.*, *Neurobiology of Aging*, vol. 17, nº 2, 183-190 (1996).

### Resultados

La descendencia de los animales fundadores expresa ARNm de APP humano en altas cantidades a lo largo de todas las estructuras del cerebro tal como se demuestra mediante hibridación *in situ*. Determinadas cantidades de proteína derivada de transgén superaban las de APP endógena en de 5 a 10 veces. A los 6 meses de edad, estos ratones muestran depósitos extracelulares de péptido  $\beta$ A4 humano en la corteza cerebral y la formación del hipocampo. Estos depósitos son positivos en impregnación con metenamina-plata, tinción con tioflavina S y birrefringencia con rojo Congo. Éstos están rodeados por astrocitos reactivos y neuritas distróficas. Además, las placas son inmunorreactivas con antisueros específicos frente a la proteína tau asociada a microtúbulos hiperfosforilada tal como se encuentra en el cerebro de pacientes con EA, lo que no se ha notificado anteriormente para animales transgénicos análogos. Por tanto, los depósitos descritos en el cerebro de estos ratones se asemejan considerablemente a las placas seniles encontradas en pacientes con EA. Cuando se tiñen para detectar la acetilcolinesterasa, se observa un fuerte marcado de las placas y una distorsión local de la red de fibras colinérgicas. Las placas contienen actividad acetilcolinesterasa en estructuras que se asemejan a neuritas distróficas, hinchadas. Esta degeneración de neuritas colinérgicas es otra característica bien conocida asociada con la EA. Además, se observa una degeneración local de las neuronas en las proximidades de las placas en zonas normalmente afectadas en la EA tales como la CA1 del hipocampo. En este caso, la pérdida de neuronas está correlacionada negativamente con la carga de placas y puede alcanzar hasta el 20%.

La hiperfosforilación de tau, la tinción de colinesterasa y la pérdida de neuronas en ratones transgénicos con APP según la invención se ilustran en la figura 1. La tinción de las placas con anticuerpo AT8 frente a tau que reconoce Ser202 y Thr205 fosforiladas de tau se muestra en una sección flotante libre sagital de un cerebro de ratón transgénico en A y en mayor ampliación en D. Las inmunotransferencias de tipo Western de extractos de cerebro de ratones transgénicos, de 6 meses (2) y 15 meses (4) de edad y controles de las crías (1,3) se muestran en B y C. Se tiñeron manchas con anticuerpos AT8 (B) y N-tau7 (C) que reconocen tau de una manera dependiente e independiente de la fosforilación, respectivamente. Los números indican los pesos moleculares de las proteínas marcadoras en kDa. E muestra la tinción para detectar acetilcolinesterasa en ratones transgénicos. Puede observarse una distorsión local de las fibras colinérgicas en las proximidades de las placas. La pérdida de neuronas piramidales en las proximidades de los depósitos de  $A\beta$  en la zona CA3 se muestra en F mediante tinción con azul de toluidina.

### Pruebas de comportamiento

Los ratones transgénicos obtenidos tal como se describió anteriormente muestran cambios de comportamiento no cognitivos significativos que corresponden a los cambios observados con pacientes que padecen la EA, tal como notificó Mega *et al.* (1996) *Neurology* 46, 130-135.

## ES 2 307 300 T3

Por ejemplo, la prueba de plataforma semiencerrada (“*Half-Enclosed Platform*”) según una modificación de Käsermann (1986) *Psychopharmacol.* 89, 31-37, en comparación con crías no transgénicas, los animales evitaron la mitad abierta y se observó un aumento de posturas y movimientos de comportamiento exploratorio tales como locomoción y levantamiento de la cabeza, indicativo de agitación, desinhibición e irritabilidad tal como se notificó para pacientes con EA.

### *Pruebas cognitivas*

Además, los ratones muestran un deterioro cognitivo significativo.

Por ejemplo, en el laberinto de agua según Morris *et al.* (1982) *Nature* 297, 681-683, en comparación con crías no transgénicas, los animales cruzaron significativamente menos el anillo que representaba la posición previa de la plataforma ( $2,5 \pm 0,5$  frente a  $4,4 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ , prueba de la U de Mann-Whitney bilateral) y pasaron un porcentaje de tiempo significativamente inferior en el cuadrante que contenía el anillo ( $20,8 \pm 3,8$  frente a  $33,1 \pm 3,2$ ;  $p < 0,05$ , prueba de la U de Mann-Whitney bilateral).

REIVINDICACIONES

5 1. Constructo de ADN recombinante que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca, unida de manera funcional a un elemento promotor de Thy-1, **caracterizado** porque dicho elemento promotor de Thy-1 es un elemento promotor de Thy-1 de roedor y dicha mutación sueca es la única mutación presente en dicho polipéptido APP.

10 2. Célula de ratón transgénico, en la que se expresa ADN que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca bajo el control transcripcional de un elemento promotor de Thy-1, **caracterizada** porque dicha mutación sueca es la única mutación presente en dicho polipéptido APP y dicho elemento promotor de Thy-1 es un elemento promotor de Thy-1 de roedor, por ejemplo, de ratón.

15 3. Ratón transgénico, **caracterizado** porque expresa un constructo de ADN recombinante según la reivindicación 1 y muestra características relacionadas con tau y APP de la patología de la EA.

20 4. Ratón transgénico según la reivindicación 3, expresándose en las células de este ratón ADN que codifica para un polipéptido APP humano que comprende la mutación sueca bajo el control transcripcional de un elemento promotor de Thy-1, **caracterizado** porque dicha mutación sueca es la única mutación presente en dicho polipéptido APP y dicho elemento promotor de Thy-1 es un elemento promotor de Thy-1 de roedor.

25 5. Método de generación de un ratón transgénico según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicho ratón se genera incorporando un constructo de ADN recombinante según la reivindicación 1 al genoma de un ratón.

30 6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque comprende la inyección de unidades de transcripción obtenidas a partir de un constructo de ADN recombinante según la reivindicación 1 en un pronúcleo de un embrión de ratón y la crianza del ratón fundador así obtenido.

35 7. Método para someter a prueba un posible agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, **caracterizado** porque o bien se usa un ratón transgénico según la reivindicación 3 o la reivindicación 4 como modelo animal o bien se usa una célula según la reivindicación 2 como célula diana.

40 8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se administra el posible agente terapéutico a un ratón transgénico generado mediante un método según la reivindicación 5 o la reivindicación 6.

45 9. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se administra el posible agente terapéutico a un ratón transgénico según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o se pone en contacto con una célula según la reivindicación 2, y se determina(n) el depósito de  $\beta$ A4 y/o la hiperfosforilación de tau.

50 10. Ensayo de selección o caracterización, **caracterizado** porque consiste en, o incluye, un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

55 11. Kit de ensayo de selección, **caracterizado** porque comprende una célula según la reivindicación 2.

45

50

55

60

65

fig.1

