



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 318 921**

② Número de solicitud: 200501208

⑤ Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **18.05.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **29.01.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **11.02.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

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

⑱ Inventor/es: **García Bustelo, Xose R. y
Sauzeau, Vincent**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Mamífero no humano carente de la expresión del gen Vav3, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Mamífero no humano carente de la expresión del gen Vav3, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

La invención se relaciona con un mamífero no humano knockout útil como modelo experimental cuyo genoma posee el gen Vav3 mutado y cuyos niveles de RNA mensajero o proteína para la proteína Vav3 endógena se encuentran alterados. Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de dicho animal no humano, así como una célula eucariota mutada. Este modelo animal o línea celular pueden emplearse en un procedimiento para determinar el efecto de un fármaco útil para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos derivados de dicha deficiencia de la proteína Vav3, por ejemplo, problemas de coordinación motora, hipertensión esencial, hiperplasia cardiaca y arterial, taquicardia y esquizofrenia.

ES 2 318 921 B1

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

DESCRIPCIÓN

Mamífero no humano carente de la expresión del gen Vav3, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

Esta invención se refiere a mamíferos en los que se ha suprimido, total o parcialmente, la expresión del gen *vav3*. Estos animales pueden ser usados para estudiar farmacológica o molecularmente enfermedades de carácter cardiovascular y/o nervioso.

10 **Estado de la técnica**

Vav3 es un miembro de la familia de oncoproteínas Vav, la cual presenta representantes en todos los metazoos animales conocidos. En el caso de vertebrados, la familia posee tres miembros (Vav, Vav2 y Vav3) que poseen funciones similares, pero no idénticas. Estas proteínas funcionan como enzimas que catalizan el intercambio de nucleótidos de guanosina sobre las GTPasas de la familia Rho/Rac, un grupo de interruptores moleculares que regulan procesos proliferativos, citoesqueléticos y de forma celular, entre otros. Gracias a su actividad catalítica, las proteínas Vav hacen posible que la activación de estas GTPasas se produzca de una manera rápida y efectiva durante procesos de señalización celular. Las proteínas Vav se regulan durante los procesos de transducción de señales mediante fosforilación directa en tirosinas. Así, estas proteínas son catalíticamente inactivas cuando están en un estado desfosforilado (lo que ocurre en células en reposo). Sin embargo, tras su fosforilación durante procesos de estimulación celular, las proteínas Vav cambian su conformación tridimensional y se activan catalíticamente. Los procesos de fosforilación se realizan a través de tirosín cinasas, las cuales pueden ser transmembrana (como por ejemplo el receptor para el factor de crecimiento epidérmico) o intracelulares (como por ejemplo las cinasas Lck, Syk, Zap70, etc.). El proceso de desfosforilación está llevado a cabo probablemente por tirosín fosfatasas, aunque su identidad permanece todavía por esclarecer. Para una revisión de la función y regulación de estas proteínas, se pueden consultar las siguientes publicaciones: Bustelo, *Mol. Cell. Biol.* 20: 1461-1477 [2000]; Bustelo, *Oncogene* 20: 6372-6381 [2001]; Bustelo, *Front. Biosci.* 7: d24-30 [2002]; Turner y Billadeau, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 476-486 [2002].

Las proteínas Vav median diversos procesos celulares. Debido a su acción sobre las GTPasas Rho/Rac, contribuyen a procesos celulares importantes como son la reorganización del citoesqueleto, la activación del ciclo celular, etc. De una manera independiente de las GTPasas Rho/Rac, participan también en otros procesos celulares como la inducción de la expresión de citocinas (vía la activación del factor transcripcional NF-AT). Las proteínas Vav pueden también activar indirectamente otras rutas celulares. Así, vía la estimulación de la fosfolipasa C-gamma, las proteínas Vav pueden activar el factor de intercambio de nucleótidos para Ras conocido por RasGRP1, lo que en última instancia determina la activación de Ras. Esta última ruta ocurre exclusivamente en células linfoides y, probablemente, nerviosas. Para una revisión de los procesos biológicos en que participan estas proteínas, se pueden consultar los siguientes artículos científicos: Bustelo, *Mol. Cell. Biol.* 20: 1461-1477 [2000]; Bustelo, *Oncogene* 20: 6372-6381 [2001]; Bustelo, *Front. Biosci.* 7: d24-30 [2002]; Turner y Billadeau, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 476-486 [2002]; Caloca *et al.*, *EMBO J.* 22:3326-3336 [2003]; Zugaza *et al.*, *Oncogene* 23: 5823-33 [2004].

Una de las enfermedades que afectan a un sector amplio de la población mundial son las derivadas de disfunciones del sistema cardiovascular. Así, la hipertensión (presión arterial elevada), afecta a un 25% de la población de sociedades industrializadas. Esta proporción aumenta con el envejecimiento poblacional, alcanzando valores del 60-70% en individuos mayores de 70 años. Esta enfermedad es un factor de riesgo para muchas causas de morbilidad y mortalidad, como son los infartos de miocardio, fallo cardiaco congestivo, enfermedades renales y ataques cerebrales. Además, generalmente va asociada a otras disfunciones del organismo, como son la obesidad abdominal, la dislipidemia, la intolerancia a glucosa, la hiperinsulinemia y la hiperuriquemia. A pesar de su importancia poblacional, todavía permanecen por esclarecer las causas moleculares que determinan la aparición de problemas en el sistema cardiovascular. Así, mientras que un 5% de casos se ha asociado a alguna disfunción genética, en el 95% de los casos (pacientes con la denominada "hipertensión esencial") la causa está todavía por definir. En todo caso, siempre se ha sospechado que uno de los problemas de la hipertensión esencial es el mal funcionamiento del sistema nervioso simpático, una parte del sistema nervioso que, entre otras funciones, tiene el papel de regular el ritmo cardiaco y la contracción del sistema vascular. Para revisiones sobre el tema, consúltense la siguientes referencias científicas: Lifton *et al.*, *Cell* 104: 545-556 [2001]; Staesen *et al.*, *The Lancet* 361: 1629-1641 [2003]; Takahashi y Smithies, *Trends in Genetics* 20: 136-145 [2004].

El circuito fisiológico que determina el control del ritmo cardiaco y presión arterial se conoce relativamente bien. Se sabe que existen hormonas que provocan tanto la vasoconstricción (angiotensina II) como la vasodilatación (bradiquinina). Los procesos moleculares y las rutas de señalización activadas por estas hormonas están también relativamente bien explorados. Para una revisión del campo, consultar las siguientes publicaciones científicas: Lifton *et al.*, *Cell* 104: 545-556 [2001]; Staesen *et al.*, *The Lancet* 361: 1629-1641 [2003]; Takahashi *et al.*, *Endocrinology* 144: 2184-2190 [2003]; Takahashi y Smithies, *Trends in Genetics* 20: 136-145 [2004].

Dada la importancia de la enfermedad cardiovascular en la población humana, existe un gran interés en desarrollar modelos animales que permitan reproducir la totalidad o parte de dicha enfermedad. Para este fin, se han preparado diferentes mamíferos que tienen niveles alterados de la expresión de ciertos genes. Una clase de estos mamíferos son los llamados mamíferos transgénicos. Estos mamíferos tienen un gen o genes nuevos introducidos en su genoma, lo que

resulta en la sobreexpresión de las proteínas codificadas por aquéllos. Otra clase de estos mamíferos son los llamados mamíferos “knockout”, en los que se ha suprimido la expresión de un gen endógeno por manipulación genética (lo que resulta en la eliminación de dicha proteína del organismo del mamífero). Como consecuencia de ello, existen ahora modelos animales con diversos parámetros del sistema cardiovascular alterados. Entre éstos se encuentran animales que sobreexpresan la enzima convertidora de la angiotensina (un enzima que provoca la formación de angiotensina II a partir de la molécula intermediaria angiotensina I), el angiotensinógeno (el precursor de la angiotensina I y II) y de la propia angiotensina II. Entre los animales knockout destaca el de la renina (un enzima que corta el angiotensinógeno para dar la angiotensina I), el de los receptores de la angiotensina II (receptores AT1_a y AT1_b) y el del receptor de la bradiquinina (B2). Aunque estos mamíferos manifiestan alteraciones en el sistema cardiovascular, su uso es limitado puesto que derivan de la alteración de genes que, en condiciones normales, no están alterados de manera causativa en la hipertensión esencial. Para revisiones científicas sobre este tema, consulté los siguientes artículos científicos: Carmeliet y Collen, *J. Pathol.* 190: 387-405 [2000]; Lifton *et al.*, *Cell* 104: 545-556 [2001]; Brede y Hein, *Regulatory Peptides* 96: 125-132 [2001]; Takahashi y Smithies, *Trends in Genetics* 20: 136-145 [2004].

Junto con los estudios en animales, otra área de investigación activa es el uso de células aisladas en cultivos celulares. En este caso, destaca el estudio de las células de músculo liso de diversos conductos vasculares. Estas células se han estudiado para elucidar las rutas de señalización utilizadas por las hormonas que regulan la presión arterial. En todo caso, su uso es más limitado que el de los modelos animales puesto que los parámetros experimentales que pueden ser estudiados en cultivos celulares son menores que los modelos animales.

Como se ha dicho anteriormente, la manipulación genética de mamíferos permite obtener animales transgénicos que expresen un determinado gen o que, por el contrario, tengan un gen inactivado mediante una mutación específica (animales “knockout” o mutantes).

En ambos casos es evidente el potencial que representa para el diseño de modelos experimentales en animales de laboratorio que sirvan para analizar la función, *in vivo*, de un determinado gen. La no expresión de un gen puede conferir un nuevo fenotipo a un animal mutante. Dependiendo del gen no expresado por dicho animal, éste puede hacerse más o menos susceptible a una alteración patológica determinada. Tales animales mutantes son modelos valiosos para el estudio *in vivo* del papel que desempeña el gen así como para el estudio de compuestos que potencialmente podrían ser útiles en el tratamiento o prevención de patologías relacionadas con la expresión nula o ineficaz del producto de dicho gen.

La patentabilidad de mamíferos transgénicos para abordar diversas causas de enfermedades humanas está ampliamente reconocida en la actualidad. Algunos ejemplos, entre muchos otros, se mencionan a continuación: patentes americanas número 4.736.866; 5.175.384; 5.175.383; 5.175.385; 5.464.764; 5.487.992; 5.627.059; 5.631.153; 6.194.633; 6.207.876; 6.239.326; 6.245.963; 6.245.965 y 6.252.132. Patentes españolas número 2.209.650A1 y 2.195.751A1.

En vista de los efectos devastadores que pueden resultar de los trastornos cardiovasculares en humanos, es necesario proporcionar sistemas *in vivo* para determinar y evaluar fármacos útiles para tratar estos trastornos.

Descripción de la invención

Descripción breve de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un mamífero no humano knockout útil como modelo experimental, en adelante animal modelo de la invención, viable, cuyo genoma posee el gen *vav3* mutado y cuyos niveles de RNA mensajero o proteína para la proteína Vav3 endógena se encuentran alterados.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un animal modelo de la invención en el que el animal es un primate knockout mutante no humano deficiente en la proteína Vav3 endógena.

Un objeto particular de la invención lo constituye un animal modelo de la invención en el que el animal es un ratón knockout mutante deficiente en la proteína Vav3 endógena (Ejemplo 1). Una realización particular de la presente invención lo constituye un animal mamífero knockout de la invención en el que el animal modelo es un ratón con su gen *vav3* endógeno inactivado debido a la inserción de secuencias de ácidos nucleicos homólogas (Ejemplo 1, Figura 1). Como consecuencia, la región 5' del gen *vav3* endógeno es interrumpida, impidiéndose la expresión de su mRNA y la traducción de la proteína Vav3 endógena (Figura 1). La zona interrumpida del gen *vav3* en este animal modelo comprende, al menos, una parte de la región promotora y del exón 1 del gen *vav3* (SEQ ID NO5) (Figura 1).

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del animal modelo de la invención, en adelante procedimiento de obtención del animal modelo de la invención, que permite la anulación funcional de la proteína Vav3 en las células germinales y/o somáticas de dicho animal modelo de la invención.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del modelo animal de la invención en el que el procedimiento se realiza por recombinación homóloga del gen *vav3* que comprende las siguientes etapas:

ES 2 318 921 B1

- a) elaboración de una construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* con selección positiva que comprende unas regiones de homología con sendas secuencias de nucleótidos presentes en dicho gen *vav3* endógeno,
- 5 b) transformación de una célula con la construcción knockout de a),
- c) selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva, y
- 10 d) las células con la construcción insertada se introducen en embriones que posteriormente son implantados en hembras receptoras para su adecuada gestación, dejándose que se desarrollen a término seguidamente.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal mamífero knockout de la invención en el que la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* murino, en concreto del ratón 129 SvJ, de la construcción knockout *vav3* de a) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO5 que está constituida por una parte de la secuencia de nucleótidos del promotor, el exón 1 y parte del intrón 1 del gen *vav3* murino, desarrollado en la invención para llevar a cabo la recombinación homóloga del gen *vav3* y en el que la célula transformada de b) es una celular embrionaria (ES) de ratón (Ejemplo 1).

En otro aspecto, otro objeto de la invención lo constituye una célula eucariota mutada, en adelante célula *vav3* mutada de la presente invención, que presenta una disrupción del gen *vav3* y que por tanto presenta una deficiencia, parcial o total, en la expresión de la proteína Vav3.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el empleo del animal knockout no humano o de la línea celular de la invención, deficientes en la proteína Vav3 endógena, en un procedimiento para la determinación del efecto de un fármaco o combinación de fármacos útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos derivados de dicha deficiencia de la proteína Vav3.

Descripción detallada de la invención

30 La invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos modelos animales de enfermedades humanas del sistema nervioso y cardiovascular, entre las que se encuentra la hipertensión, hiperplasia cardíaca y arterial, fallos renales, taquicardia, la enfermedad de Parkinson y esquizofrenia.

35 La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que la anulación de la actividad funcional de la proteína Vav3 en las células de un animal provoca una serie de alteraciones que permite el desarrollo de un animal modelo de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso simpático, en general, y, en particular, un modelo de hipertensión, fallos renales, taquicardia, enfermedades con trastornos motores y esquizofrenia que es viable, fértil y no manifiesta, en condiciones de laboratorio, ningún síntoma que los diferencie de ratones genéticamente similares pero carentes de dicha mutación. En condiciones de estabulación controlada, estos ratones mutantes en la proteína Vav3 endógena son indistinguibles de sus hermanos de carnada salvajes. Sin embargo, la caracterización fina de estos ratones indica que la eliminación de la proteína Vav3 endógena está asociada a desórdenes del sistema nervioso simpático y, como consecuencia, de una profunda desregulación del control del sistema cardiovascular. Esta disfunción conlleva la aparición de una enfermedad cardiovascular clásica que combina taquicardia, hipertensión e hiperplasia cardíaca y arterial. La patología que está detrás de estas disfunciones está relacionada con la falta de formación de sinapsis GABAérgicas en la médula ventrolateral, las cuales ejercen funciones inhibitorias sobre el sistema nervioso simpático.

En concreto se ha determinado que el gen *vav3* está implicado en la regulación del sistema cardiovascular y nervioso y que su supresión provoca alteraciones de los mismos.

50 El mamífero no humano mutante o knockout de la invención puede ser utilizado como modelo animal para estudiar *in vivo* el papel desempeñado por la proteína Vav3 endógena así como en el diseño y evaluación de compuestos químicos que podrían ser potencialmente interesantes para el tratamiento de alteraciones patológicas relacionadas con la expresión nula o ineficaz del producto de dicho gen, o en las que estuvieran involucrado el gen *vav3*. Y más concretamente, por las disfunciones en sistema nervioso y cardiovascular observadas, el animal de la presente invención deficiente en la proteína Vav3 endógena puede resultar útil tanto para el estudio de patologías asociadas a neuronas simpáticas (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson) y cardiovasculares (hipertensión, fallos renales, taquicardia) como para la validación y/o el desarrollo de fármacos diseñados para regular o paliar los efectos de las alteraciones y condiciones patológicas en las que está implicada la proteína Vav3 endógena. Como prueba de ello, la enfermedad cardiovascular de estos animales puede ser prevenida tratándolos con fármacos anti-hipertensivos en uso en humanos en estos momentos, como son el losartán y el captopril (ver Ejemplo 2F y 2G)).

65 Tal como se describe a continuación el modelo animal de la invención presenta simultáneamente varias alteraciones bioquímicas como un incremento de los niveles de renina, ECA, angiotensina II y de los receptores de AT1a y AT1b y una disminución de los niveles de bradiquinina relacionados con alteraciones cardiovasculares como la HTA, la hiperplasia o hipertrofia aórtica y cardíaca y taquicardia; lo cual no deja de ser una ventaja con respecto a otros modelos animales descritos en los cuales las alteraciones de estos factores se presentan de forma única.

ES 2 318 921 B1

Asimismo, dicho mamífero no humano mutante de la invención puede ser utilizado como fuente de células para cultivos celulares.

5 Así, en primer aspecto, la invención se relaciona con un mamífero no humano knockout útil como modelo experimental, en adelante animal modelo de la invención, viable, cuyo genoma posee el gen *vav3* mutado y cuyos niveles de RNA mensajero o proteína para la proteína Vav3 endógena se encuentran alterados.

10 Tal como se utiliza en la presente invención el término “mamífero no humano” se refiere a un animal mamífero no humano de cualquier fondo genético, preferentemente animales de laboratorio como roedores, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, pertenecientes al siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones; y primates no humanos.

15 El término “knockout” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la supresión parcial o total de la expresión de al menos una parte de una proteína codificada por una secuencia de DNA endógeno en una célula, tanto en su forma de RNA como proteica. El mamífero no humano knockout de la invención posee células somáticas y germinales en las que al menos un alelo (+/-) y, preferentemente, ambos alelos (+/+), del gen *vav3* endógeno contienen un DNA exógeno que ha sido insertado en dicho gen de manera que dicho mamífero no humano mutante no expresa la proteína Vav3 endógena.

20 Las expresiones “Vav3” o “proteína Vav3” se refieren a una enzima intracelular cuya actividad es dependiente de fosforilación en tirosinas y que promueve el intercambio de nucleótidos de guanosina en las GTPasas de la familia Rho/Rac (Bustelo y Movilla, *Mol. Cell. Biol.* 19: 7870-7885 [1999]; Bustelo, *Mol. Cell. Biol.* 20: 1461-1477 [2000]). Como referencia de la proteína Vav3 puede utilizarse la proteína Vav3 codificada por el cDNA del *vav3* murino (Genebank, número de acceso AF067816).

25 Otro objeto particular de la invención lo constituye un animal modelo de la invención en el que el animal es un primate knockout mutante no humano deficiente en la proteína Vav3 endógena.

30 Un objeto particular de la invención lo constituye un animal modelo de la invención en el que el animal es un ratón knockout mutante deficiente en la proteína Vav3 endógena (Ejemplo 1). Una realización particular de la presente invención lo constituye un animal mamífero knockout de la invención en el que el animal modelo es un ratón que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO5, perteneciente al gen *vav3*, interrumpida por el gen *neo* de resistencia a antibióticos y otras secuencias reguladoras que conlleva la inactivación del gen *vav3* endógeno mediante recombinación homóloga (Ejemplo 1, Figuras 1 y 2). Como consecuencia, la región 5' del gen *vav3* endógeno es interrumpida, impidiéndose la expresión de su mRNA y la traducción de la proteína Vav3 endógena (Figura 1). La zona interrumpida del gen *vav3* en este animal modelo comprende, al menos, una parte de la región promotora y del exón 1 del gen *vav3* (SEQ ID NO5) (Figura 1).

40 En una realización particular, dicho mamífero no humano deficiente en la proteína Vav3 endógena, es un mutante heterocigoto para dicha mutación, mientras que en otra realización particular, dicho mamífero no humano mutante, es un mutante homocigoto para dicha mutación. La descendencia del mamífero no humano mutante deficiente en la proteína Vav3 endógena constituye un aspecto adicional de la presente invención.

45 Está incluido dentro del alcance de esta invención un animal no humano en el que, además de la supresión de la expresión del gen *vav3*, se ha suprimido la expresión de uno o más genes distintos. Dichos animales no humanos se pueden generar repitiendo los procedimientos establecidos aquí para generar cada construcción knockout, o reproduciendo mamíferos, cada uno con un gen con la expresión suprimida distinto, y cribando los del genotipo knockout doble. Estas manipulaciones pueden ser fácilmente realizadas por un experto del sector de la técnica.

50 Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del animal modelo de la invención, en adelante procedimiento de obtención del animal modelo de la invención, que permite la anulación funcional de la proteína Vav3 en las células germinales y/o somáticas de dicho animal modelo de la invención.

55 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del modelo animal de la invención en el que el procedimiento se realiza por recombinación homóloga del gen *vav3* que comprende las siguientes etapas:

- 60 a) elaboración de una construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* con selección positiva que comprende unas regiones de homología con sendas secuencias de nucleótidos presentes en dicho gen *vav3* endógeno,
- b) transformación de una célula con la construcción knockout de a),
- 65 c) selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva, y
- d) las células con la construcción insertada se introducen en embriones que posteriormente son implantados en hembras receptoras para su adecuada gestación, dejándose que se desarrollen a término seguidamente.

ES 2 318 921 B1

En la presente invención la expresión “construcción knockout de recombinación homóloga *vav3*” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está diseñada para disminuir o suprimir la expresión de la proteína *vav3* codificada por una secuencia de nucleótidos endógena en una célula. Como un objeto particular esta secuencia de ácido desoxirribonucleico usada como construcción knockout *vav3* comprende:

- a. una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3*,
- b. una secuencia marcadora empleada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula transfectada, y
- c. la presencia de “brazos” con secuencias nucleotídicas idénticas al gen endógeno con el fin de facilitar la recombinación homóloga del vector knockout con el gen endógeno.

Por otro lado, la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de la construcción knockout de (i) puede comprender:

- a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen *vav3*,
- b) una secuencia promotora total o parcial del gen *vav3*, o
- c) cualquiera de sus combinaciones.

Además, también puede ser una secuencia de cDNA del gen *vav3* siempre que el cDNA sea suficientemente largo. Generalmente, el DNA será de al menos 1 kilobase (kb) de longitud y preferiblemente 3-4 kb de longitud, proporcionando así secuencia complementaria suficiente para la hibridación cuando se introduce la construcción knockout en el DNA genómico de la célula ES. Dicha secuencia de ácido nucleico debe comprender al menos una parte de un exón de la secuencia que codifica Vav3 unido a una secuencia marcadora.

La secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de la construcción knockout de (i) puede obtenerse a partir de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las formas homólogas del gen *vav3* existentes en un mamífero no humano perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones no humanos. A partir de la información existente en estado de la técnica un experto puede elaborar construcciones knockout *vav3*, e igualmente vectores knockout *vav3*, para obtener distintos animales mamíferos no humanos de la invención.

La construcción knockout ligada se puede insertar directamente en células madre embrionarias o, alternativamente, se puede poner primero en un vector adecuado para amplificarlo antes de la inserción. En este último caso la construcción knockout debe ser linealizada primero. Para insertar la secuencia de DNA, el DNA de la construcción knockout se añade a las células ES en condiciones adecuadas para el método de inserción elegido. Cuando se va a introducir más de una construcción en la célula ES, el DNA que codifica cada construcción se puede introducir simultáneamente o uno cada vez.

Son vectores preferidos los que se amplifican rápidamente en células bacterianas (tales como el vector pBluescript II SK (Stratagene, San Diego, CA, EE.UU.) ó pZERO-2 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU)) (Ejemplo 1).

La construcción knockout *vav3* se inserta en una célula, integrándose con el DNA genómico de la célula en una posición tal que prevenga o interrumpa la transcripción de la secuencia de DNA nativa. Dicha inserción se produce por recombinación homóloga (es decir, regiones de la construcción knockout y del gen endógeno, homólogas entre sí, se hibridan entre sí tras la introducción del vector knockout en la célula anfitriona, lo que resulta en la sustitución de la secuencia endógena por la exógena).

Típicamente la construcción knockout se introduce en una célula madre embrionaria (ES), integrándose en su DNA genómico normalmente por el procedimiento de recombinación homóloga. Una vez generada, esta célula ES se inyecta en, y se integra con, el embrión en desarrollo. Las células madre embrionarias (células ES) usadas para producir los mamíferos knockout serán de la misma especie que los mamíferos knockout que se van a generar. Así, por ejemplo, normalmente se usarán células madre embrionarias de ratón para generar ratones knockout, o células madre embrionarias de primate para generar primates knockout.

Típicamente se seleccionan las células madre embrionarias por su capacidad para integrarse en, y convertirse en parte de la línea germinal de, un embrión en desarrollo para crear así transmisión de línea germinal de la construcción knockout. Por lo tanto, cualquier línea de células ES que se crea que tiene esta capacidad es adecuada para usar aquí. Las células se cultivan y se preparan para la inserción de DNA usando métodos bien conocidos por los expertos tales como los establecidos por Robertson (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. IRL Press, Washington, D.C. [1987]) y por Bradley *et al.* (Current Topics in Devel. Biol., 20:357-371 [1986]) y por Hogan *et al.* (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1986]).

ES 2 318 921 B1

La inserción de la construcción knockout en las células ES se puede llevar a cabo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo, electroporación, microinyección, y tratamiento con fosfato cálcico (véase Lovell-Badge, en Robertson, ed., referencia indicada más arriba). Un método preferido de inserción es la electroporación.

5

Cualquiera de las construcciones knockout de recombinación homóloga *vav3* mencionadas anteriormente pueden ser utilizadas para llevar a cabo el procedimiento de obtención del animal modelo de la invención y forman parte de la misma.

10

Además, otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal modelo de la invención en el que la construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* de a) es una secuencia de ácido nucleico que comprende:

15

(i) una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3*,

(ii) una secuencia marcadora empleada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula transfectada, y

20

(iii) la presencia de "brazos" con secuencias nucleotídicas idénticas al gen endógeno con el fin de facilitar la recombinación homóloga del vector knockout con el gen endógeno.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal modelo de la invención en el que secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* (i) puede constar de:

25

a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen *vav3*,

b) una secuencia promotora total o parcial del gen *vav3*,

30

c) cualquiera de sus combinaciones, o

d) una secuencia de cDNA de *vav3*.

35

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal modelo de la invención en el que la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de la construcción knockout de (i) es una cualquiera de las formas homólogas del gen *vav3* existentes en un mamífero no humano perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a un animal del siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones y primates no humanos.

40

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal modelo de la invención en el que la célula transformada de b) es una célula madre embrionaria (ES).

45

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal mamífero knockout de la invención en el que la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* murino (i), en concreto del ratón 129 SvJ, de la construcción knockout *vav3* de a) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO5 que está constituida por una parte de la secuencia de nucleótidos del promotor, el exón 1 y parte del intrón 1 del gen *vav3* murino, desarrollado en la invención para llevar a cabo la recombinación homóloga del gen *vav3* y en el que la célula transformada de b) es una celular embrionaria (ES) de ratón (Ejemplo 1).

50

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de clonación, en adelante vector clonación *vav3*, que comprende la construcción knockout *vav3* de la invención. Una realización particular del vector de clonación de la invención lo constituye el vector p38LoxPNeobGHpA/Vav3 que contiene regiones homólogas al gen *vav3* endógeno junto con otras secuencias correspondientes al gen neo y varias regiones reguladoras (Ver Figura 1 y Ejemplo 1).

55

En otro aspecto, otro objeto de la invención lo constituye una célula eucariota mutada, en adelante célula *vav3* mutada de la presente invención, que presenta una disrupción del gen *vav3* y que por tanto presenta una deficiencia, parcial o total, en la expresión de la proteína Vav3.

60

Otro objeto particular de la invención lo constituye una célula *vav3* mutada de la invención caracterizada porque es una célula pluripotente indiferenciada, tal como una célula ES (del inglés, embryonic stem), establecida a partir de la masa interna celular de un embrión knockout de la invención en la fase preimplantatoria denominada blastocisto. Estas células normalmente expresan el producto del gen *vav3* pero la disrupción de dicho gen impide la expresión total o parcial de la proteína Vav3. De esta forma, dichas células pueden ser heterocigotas, es decir, que contienen un alelo mutante y un alelo tipo salvaje del gen *vav3* endógeno o bien homocigotas, es decir, que contienen los dos alelos mutantes del gen *vav3* endógeno.

65

ES 2 318 921 B1

Estas células pueden ser propagadas y, opcionalmente, immortalizadas por un experto en base al conocimiento existente en el estado de la técnica de tal forma que constituyan una línea celular con alteración de la expresión de la proteína Vav3 parcial o totalmente.

5 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una célula *vav3* mutada de la invención caracterizada porque es una célula diferenciada.

10 La disrupción funcional del gen *vav3* endógeno se puede producir de distintas formas. En primer lugar, se puede realizar mediante recombinación homóloga entre la construcción knockout *vav3* de la invención y el correspondiente gen *vav3* endógeno de dicha célula hospedadora. La transformación celular mediante recombinación homóloga del gen *vav3* provoca una disrupción de dicho gen celular y la deficiencia de la proteína Vav3 que se traslada de forma constante a la prole de dicha célula.

15 Por otro lado, pueden existir otras formas para inducir la disrupción de un gen en una célula mediante un procedimiento de transgénesis de anulación de la actividad funcional de un gen. En este procedimiento de transgénesis comprende la transformación de una célula eucariota mediante la introducción de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen *vav3* capaz de anular su actividad biológica, seleccionándose dicho elemento inhibidor entre:

- 20 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Vav3,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Vav3,
- 25 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Vav3, y
- d) un RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico del mRNA de la proteína Vav3.

30 Ventajosamente, dicha construcción génica está incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia. Las secuencias de nucleótidos a)-d) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína Vav3, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) *Transgenesis Techniques. Principles and Protocols*, 2ª Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Fernández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 75-97; Kikuchi, *et al.*, 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22 (3): 326-330).

40 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la célula mutada de la presente invención aislada a partir de un mamífero knockout no humano de la invención deficiente en la proteína Vav3 endógena.

45 Una realización particular de la presente invención lo constituye una célula mutada de la invención seleccionada preferentemente de una línea celular perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a una estirpe del siguiente grupo: células del sistema nervioso y del sistema cardiovascular.

50 Los mamíferos de esta invención tienen una variedad de usos relacionados con la regulación de la actividad del sistema nervioso simpático y del sistema de regulación cardiovascular. Así, estos mamíferos se pueden usar para evaluar o identificar fármacos útiles para la regulación cardiovascular y simpática, es decir, fármacos que potencien o inhiban dichas actividades. La determinación de fármacos útiles implicaría administrar el fármaco candidato al ratón knockout con una variedad de dosis, ensayándose seguidamente a diferentes puntos de tiempo los efectos del fármaco en el trastorno nervioso o cardiovascular que se está evaluando (ver por ejemplo los parámetros estudiados en el Ejemplo 2).

55 Un mamífero de la presente invención se podría usar para cribar una variedad de compuestos, solos o en combinación, para determinar si resulta una restauración o activación parcial o total de la respuesta simpática o cardiovascular. Se podría aplicar la misma estrategia para encontrar compuestos que fueran útiles para suprimir los efectos patológicos observados en muchos pacientes con hipertensión esencial o de base genética.

60 Además, los mamíferos de la presente invención pueden ser útiles para evaluar el desarrollo del sistema nervioso simpático y sus conexiones con otras células, así como para estudiar los efectos de mutaciones de genes particulares. Otros usos pueden incluir la prevención o tratamiento de otros desórdenes del sistema nervioso simpático como, por ejemplo, condiciones de estrés. Finalmente, dado la alta producción de dopamina en estos mamíferos knockout, se podría evaluar el efecto del gen *vav3* en procesos degenerativos de células dependientes de dicho neurotransmisor, como es el caso de la enfermedad de Parkinson.

65 Dado que la proteína Vav3 parece ser importante para procesos citoesqueléticos que determinan, entre otras cosas, la adecuada formación de sinápsis en diversas zonas del sistema nervioso, estos ratones podrían ser de interés para

ES 2 318 921 B1

el diseño de compuestos capaces de prevenir, reducir o aliviar patologías derivadas de dichas alteraciones en la relación célula-célula (por ejemplo, trastornos motores derivados del mal funcionamiento del sistema nervioso central o periférico).

5 Por lo tanto, otro objeto de la invención lo constituye el empleo del animal knockout no humano o de la línea celular de la invención, deficientes en la proteína Vav3 endógena, en un procedimiento para la determinación del efecto de un fármaco o combinación de fármacos útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos derivados de dicha deficiencia de la proteína Vav3.

10 Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de del animal knockout no humano o de la línea celular de la invención en un procedimiento para determinar el efecto de un fármaco que comprende las siguientes etapas:

15 a) administración del fármaco o fármacos en forma y dosis adecuada al animal knockout no humano de la invención o a la célula knockout no humano de la invención *in vitro*, y

b) determinación de su efecto sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav3.

20 Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de un animal knockout o una célula knockout no humana de la invención en el que los fármacos son útiles para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: hipertensión esencial o de base genética, hiperplasia cardíaca o arterial, procesos nerviosos, como por ejemplo la enfermedad de Parkinson, procesos neurodegenerativos motores, o esquizofrenia.

25 Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de un animal knockout o una célula knockout no humana de la invención en el que la determinación del efecto de los fármacos ensayados b) se realizaría sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav3, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: niveles de presión arterial, ritmo cardíaco, histología del sistema nervioso y cardiovascular, niveles de moléculas reguladoras del estado cardiovascular (por ejemplo, angiotensina II, bradiquinina, así como sus reguladores biosintéticos y receptores), de neurotransmisores del sistema nervioso simpático (diversos tipos de catecolaminas), de moléculas que intervienen en la regulación del sistema nervioso simpático (por ejemplo, GAD65, GAT1, TH, GABA, glutamato) y cardiovascular (marcadores intracelulares, transmembranarias y extracelulares producidas por las células vasculares del músculo liso).

35 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el empleo de un animal knockout de la invención en el que el animal es un roedor o un primate no humano.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el empleo de de una línea celular de la invención en el que la línea celular es una línea, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, derivada del sistema nervioso y/o cardiovascular.

45 El origen de estos fármacos que son evaluados puede ser variado, de tal forma que pueden ser origen natural (por ejemplo, de origen vegetal, bacteriano, vírico, animales o microorganismos eucariotas) o sintético, y presentan también una naturaleza variada como por ejemplo un péptido, una proteína, un ácido nucleico, carbohidratos, un anticuerpo, un compuesto químico, o cualquier otro tipo de molécula que modifique el parámetro analizado.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 describe la construcción knockout usada para suprimir la expresión de la proteína Vav3. La Figura 1A (línea superior) describe la estructura de una parte del gen *vav3* endógeno. La Figura 1B (línea central) describe la construcción del vector para la realización del knockout de *vav3* generado. La Figura 1C (línea inferior) describe la estructura del gen *vav3* tras recombinación homóloga y la incorporación de las secuencias que interrumpen el gen en su interior. Con la excepción de las enzimas EcoRI y NruI, otros sitios de corte para otras enzimas de restricción se indican con abreviaturas (**A**, Acc65i; **B**, BamHI; **H**, HindIII; **RV**, EcoRV; **S**, SacI; **Sp**, SpeI; **X**, XbaI). Los sitios de restricción que se han eliminado tras la construcción del vector knockout están tachados con un aspa. La flecha del vector de recombinación homóloga (línea central) indica la dirección de la transcripción del gen que se usa en la selección positiva (*neo^R*, gen de resistencia a la neomicina). El exón 1 del gen *vav3* se indica en color negro (posee un NruI interno). Las regiones del gen *vav3* utilizadas en los brazos del vector de recombinación homóloga se indican mediante rectángulos rayados. Las sondas 5' y 3' para el análisis por Southern blot de las integraciones se indican como rectángulos punteados. Las flechas de la línea inferior indican los tamaños relativos de los fragmentos diagnósticos para identificar los portadores de los alelos salvaje (WT) y knockout (KO). La longitud de cada fragmento (en kilobases) se indica en el centro de cada flecha.

65 La Figura 2 muestra un ensayo por Southern blot, en donde DNAs genómicos procedentes de ratones salvajes (+/+), heterocigotos (+/-) u homocigotos knockout (-/-) digeridos con las enzimas de restricción EcoRV (panel izquierdo) y HindIII (panel derecho) han sido transferidos a papel de nitrocelulosa e hibridados con sondas marcadas radioactivamente de la región 5' y 3'. La flechas indican la migración de las bandas correspondientes al alelo salvaje (WT, del inglés wild type) y knockout (KO).

ES 2 318 921 B1

La Figura 3 muestra una tabla en donde se resumen los valores medios y desviaciones estándar obtenidas del peso, ritmo cardiaco (en latidos por minuto), presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) (todas ellas expresadas en milímetros de mercurio) de ratones salvaje (WT), *vav3* (+/-) (heterocigotos) y *vav3* (-/-) (homocigotos para el alelo knockout). Como se ve en la tabla, los ratones *vav3* (-/-) - pero no los *vav3* (+/-)-, poseen una marcada taquicardia e hipertensión cuando se comparan con los ratones salvajes *vav3* (+/+). El asterisco indica un índice de probabilidad estadístico menor del 0.01.

La Figura 4 muestra la histología de cortes de aorta y corazón (ambos teñidos con hematoxilina-eosina) procedentes de ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) de las edades indicadas (parte superior). Las aortas y los corazones se muestran en los dos paneles superiores e inferiores, respectivamente. Los asteriscos negros y blancos señalan la media de la aorta y el ventrículo izquierdo del corazón, respectivamente. Es evidente que, a partir de los cuatro meses de edad, los ratones *vav3* (-/-) experimentan los siguientes cambios cuando se comparan con los ratones salvajes control: (i) hiperplasia de la media de la aorta (comparar dos primeras líneas). Ésta se debe tanto a mayores números de células de músculo liso como de fibras de colágeno y elastina; (ii) una desorganización de la media de la aorta, que pierde su estructura estratificada típica; (iii) una hiperplasia del ventrículo izquierdo del corazón (comparar las dos últimas líneas).

La Figura 5 muestra los niveles de actividad o expresión de moléculas implicadas en la regulación cardiovascular. La Figura 5A describe los niveles de actividad de la proteasa renina en ratones salvajes (barras negras) y homocigotos knockout (barras blancas) (expresada en nanomoles por hora) de cuatro meses de edad. La Figura 5B describe los niveles de actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en ratones salvaje (barras negras) y knockout (barras blancas) de cuatro meses de edad. La Figura 5C describe los niveles de expresión relativos del RNA mensajero para los receptores AT₁ (AT_{1a} y AT_{1b}) de la angiotensina II en los tejidos indicados en los ratones salvajes (barras negras) y homocigotos knockout (barras blancas) de cuatro meses de edad. La Figura 5D, E muestra la evolución de los niveles plasmáticos de angiotensina II (panel D, expresado en picogramos por mililitro de plasma) y bradiquinina (panel E, expresado en picomoles por litro de plasma) en ratones *vav3* (+/+) y (-/-) en ratones de las edades indicadas (expresada en meses). Estas determinaciones se realizaron utilizando técnicas de radioinmunoensayo (RIA, paneles A y B), reacción en cadena de la polimerasa en modalidad cuantitativa (panel C) y ELISA (paneles D y E). Los símbolos “#” y “*” indican índices de probabilidad estadístico menor del 0.05 y 0.01, respectivamente. Los resultados presentados en esta figura indican que, cuando se comparan con los ratones *vav3* (+/+), los ratones *vav3* (-/-) poseen las siguientes alteraciones fisiológicas: (i) aumento de los niveles de actividad de la renina (panel A); (ii) aumento de la actividad de la ECA (panel B), (iii) expresión elevada del mRNA de los receptores AT₁ (panel C), (iv) niveles elevados de angiotensina II desde un mes tras el nacimiento y hasta, al menos, 12 meses de vida (panel D), (v) niveles disminuidos de bradiquinina a partir de un mes de edad (panel E).

La Figura 6A muestra un esquema de la formación de la angiotensina II a partir del angiotensinógeno. Esta formación se realiza a través de dos cortes proteolíticos sucesivos que están catalizados por la renina y la ECA. Tras la generación de la angiotensina II, ésta ejerce efectos a través de la interacción con receptores de membrana específicos como el AT₁, el AT₂, u otros (esquemáticos aquí genéricamente con el nombre de AT_n). El esquema muestra también los dos inhibidores que se utilizarán en la Figura 6B y 7. En el primer caso se trata del losartán, un antagonista de la angiotensina II que bloquea su interacción con los receptores de tipo AT₁. En el segundo caso se trata del captopril, una molécula que inhibe la actividad del enzima ECA. La Figura 6B muestra el efecto del losartán sobre la presión arterial de los ratones *vav3* (+/+) (barras negras) y *vav3* (-/-) (barras blancas) tras 30 minutos de tratamiento. Se aprecia que el tratamiento con losartán produce una rápida disminución de la presión arterial media (expresada en milímetros de mercurio) tanto en los ratones salvajes como homocigotos knockout. Los ratones usados tenían una edad de cuatro meses.

La Figura 7 muestra los efectos del tratamiento con captopril sobre diferentes parámetros cardiovasculares de los ratones salvaje y homocigoto knockout. En este caso, los ratones de 3 meses de edad fueron tratados *ad libitum* en ausencia (-) o presencia (+) de captopril (presente en el agua que bebían) durante cinco semanas. Tras dicho tratamiento, se evaluó la presión arterial media (panel A, expresada en milímetros de mercurio), los niveles de angiotensina II en plasma (panel B, expresado en picogramos por mililitro), y la histología del corazón (panel C, imágenes de la línea superior) y aorta (panel C, imágenes de la línea inferior). En todos los paneles se aprecia que el tratamiento con captopril inhibe la enfermedad cardiovascular típica de los ratones *vav3* (-/-), tal como se ve en los niveles bajos de presión arterial (A) y de angiotensina II (B) así como en las histologías normales de sus aortas y corazones (C). Los efectos del losartán (Figura 6B) y captopril (Figura 7) sobre la enfermedad cardiovascular de los ratones *vav3* (-/-) confirma que la desregulación de la ruta de la angiotensina II está detrás de dicha patología. El asterisco indica un índice de probabilidad estadístico menor del 0.01.

La Figura 8 muestra la evolución durante la vida de los ratones salvaje y homocigoto knockout para *vav3* de los niveles plasmáticos de catecolaminas (neurotransmisores específicamente liberados por las neuronas del sistema nervioso simpático). La Figura 8A muestra los niveles de noradrenalina (expresados en nanomoles por litro de plasma). La Figura 8B muestra los niveles de adrenalina (expresados en nanomoles por litro de plasma). La Figura 8C muestra los niveles de dopamina (expresados en nanomoles por litro de plasma). Estos valores se calcularon utilizando técnicas de ELISA (para la noradrenalina y la adrenalina) y RIA (para el cálculo de los niveles de dopamina) con ratones de la edad indicada (expresada en meses). Los resultados presentados en esta figura indican que los ratones *vav3* (-/-) poseen, desde el nacimiento, niveles elevados de las tres catecolaminas.

La Figura 9 muestra los niveles del enzima tirosín hidroxilasa (TH) en diversas áreas del sistema nervioso simpático. La TH es un marcador específico del sistema nervioso simpático, siendo el enzima que cataliza el paso limitante de la producción de catecolaminas en dichas células. Los niveles de TH se analizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas usando un anticuerpo específico contra la TH. Las áreas que se estudiaron fueron la médula de la glándula adrenal, cortes de cerebro y zonas del cerebro como el bulbo olfatorio, fibras simpáticas, y el área tegmental ventral. En todas ellas puede verse un aumento de los niveles de TH en los ratones *vav3* (-/-) cuando se comparan con zonas similares procedentes de ratones *vav3* (+/+).

La Figura 10 muestra la hiperplasia de la médula de la glándula suprarrenal en los ratones *vav3* (-/-). La Figura 10A muestra secciones histológicas (teñidas con hematoxilina-eosina) de glándulas suprarrenales de ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) a las edades indicadas. Se aprecia un aumento significativo del tamaño de las glándulas con la edad en los ratones *vav3* (-/-). La Figura 10B muestra la evolución del peso de la glándula suprarrenal (expresada en miligramos) en los ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) a diferentes edades (expresadas en meses). Se aprecia un aumento progresivo en el peso de las cápsulas de los ratones homocigoto knockout. La Figura 10C demuestra que el aumento en el tamaño de la glándula suprarrenal se debe exclusivamente a una hiperplasia de su región medular y no de la cortical, como se aprecia por el aumento de la razón médula/córtex en dichos animales.

La Figura 11 describe el efecto del propranolol sobre la enfermedad cardiovascular presente en los ratones *vav3* (-/-). El propranolol es una molécula antagonista de los receptores beta-adrenérgicos, por lo que bloquea la acción de las catecolaminas producidas por el sistema nervioso simpático. El tratamiento con propranolol siguió el mismo sistema que el tratamiento con captopril mencionado en la Figura 7 (ver más arriba). La Figura 11A muestra el efecto del propranolol sobre la presión arterial media (expresada en milímetros de mercurio) de los ratones *vav3* (+/+) (barras negras) y *vav3* (-/-) (barras blancas). La Figura 11B muestra el efecto del propranolol sobre el ritmo cardíaco (expresado en latidos por minuto) de los ratones *vav3* (+/+) (barras negras) y *vav3* (-/-) (barras blancas). La Figura 11C muestra el efecto del propranolol sobre los niveles de angiotensina II (expresados en picogramos por mililitro de plasma) de los ratones *vav3* (+/+) (barras negras) y *vav3* (-/-) (barras blancas). La Figura 11D muestra que el tratamiento con propranolol bloquea la aparición de la hipertrofia de la aorta (paneles inferiores) y del ventrículo izquierdo del corazón característico (paneles superiores) de los ratones *vav3* (-/-). El asterisco indica un índice de probabilidad estadístico menor del 0.01. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el propranolol bloquea completamente la aparición de los diferentes parámetros de la enfermedad cardiovascular en los ratones *vav3* (-/-).

La Figura 12 muestra el efecto de la bicuculina (un inhibidor de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas), de la noradrenalina y el GYK152466 (un inhibidor de las sinapsis estimuladoras de glutamato) sobre la presión arterial (expresada en milímetros de mercurio) de los ratones *vav3* (+/+) (líneas oscuras) y *vav3* (-/-) (líneas claras). La Figura 12A muestra la detección en tiempo real de la presión arterial (expresada en milímetros de mercurio) de ratones con los genotipos indicados tras el tratamiento la introducción en el torrente sanguíneo de la bicuculina (10 mg/kg) o noradrenalina (10 µg/kg). Se aprecia que los ratones *vav3* (-/-) no responden adecuadamente al tratamiento con la bicuculina pero, como cabría esperar, sí lo hacen tras la inyección de noradrenalina, una catecolamina que induce aumento de la presión arterial debido a sus actividades vasoconstrictoras. La Figura 12B muestra el resumen de los valores obtenidos con 5 ratones independientes del pico máximo de presión arterial (en milímetros de mercurio) obtenido tras el tratamiento con la bicuculina. Se aprecia que, a diferencia de los ratones *vav3* salvajes, los ratones *vav3* (-/-) responden marginalmente al tratamiento con bicuculina. La Figura 12C muestra la variación (sobre su control respectivo) de los niveles de adrenalina y noradrenalina en el plasma de los animales *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) tras el tratamiento con bicuculina. Estos valores fueron obtenidos mediante la técnica de ELISA. Puede comprobarse que, a diferencia de los ratones salvajes, los ratones *vav3* (-/-) no incrementan las catecolaminas tras el tratamiento con bicuculina. La Figura 12D muestra la detección en tiempo real de la presión arterial (expresada en milímetros de mercurio) de ratones con los genotipos indicados tras el tratamiento la introducción en el torrente sanguíneo del GYK152466 (10 mg/kg) o noradrenalina (10 µg/kg). Se aprecia dicho tratamiento no ejerce efectos detectables sobre ninguno de estos ratones. El asterisco indica un índice de probabilidad estadístico menor del 0.01.

La Figura 13 muestra el estado de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas de la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-). En la Figura 13A, se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para detectar la expresión en la médula ventrolateral de estos animales de las moléculas GAD65 (un enzima que interviene en la síntesis del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico, GABA) y GAT-1 (un transportador de GABA). Como controles, se incluyeron inmunohistoquímicas usando anticuerpos contra el enzima TH y la propia proteína Vav3. Se aprecia, como era de esperar, un aumento en los niveles de TH y la eliminación de la proteína Vav3 en los ratones *vav3* (-/-). De manera más importante, se ve que los ratones *vav3* (-/-) carecen de niveles adecuados de GAD65 y GAT-1, indicando que las sinapsis inhibitorias GABAérgicas no se han formado adecuadamente. La Figura 13B muestra una medición independiente de los niveles de expresión de la TH, GAD65 y Vav3 mediante la técnica de Western blot en extractos celulares procedentes de la médula ventrolateral de ratones *vav3* (+/+), *vav3* (+/-) y *vav3* (-/-). Como control de carga, se detectaron los niveles de actina (una proteína citoesquelética) en los mismos extractos celulares.

La Figura 14 muestra el estado de las sinapsis simétricas y asimétricas en las neuronas simpáticas de la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-). La Figura 14A muestra una microscopía electrónica donde se aprecia una reducción significativa en el número de sinapsis simétricas (GABAérgicas, indicadas con flechas blancas) en la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (-/-). La Figura 14B muestra un histograma donde se cuantifican el número de las sinapsis simétricas (panel izquierdo) y asimétricas (panel derecha) en la médula ventrolateral de ratones *vav3*

ES 2 318 921 B1

(+/+) (negro) y *vav3* (-/-) (blanco). En la Figura puede apreciarse un descenso significativo de las sinápsis simétricas pero no de las asimétricas.

Ejemplos de realización

La invención se entenderá mejor con referencia al siguiente ejemplo. Dicho ejemplo no se debe considerar de ninguna forma limitante del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de un ratón knockout de vav3

I.I. Preparación de la construcción de DNA knockout

Un cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés *bacterial artificial chromosome*) que contenía secuencias del gen *vav3* murino fue identificado por un rastreo por PCR de una genoteca de BACs de DNA genómico construida a partir de la cepa de ratón 129 SvJ. Para ello, se utilizaron un paquete de cebadores oligonucleotídicos (23F: 5'-GGACATGGAGCCGTGGAAGC-3' (SEQ ID NO1) y 168R: 5'-TGAGCAGCTGGCAGAGCAGG-3' (SEQ ID NO2)) diseñados a partir de la secuencia de cDNA del *vav3* murino (Genbank, número de acceso AF067816). El clon de BAC (que recibió el número de referencia 26520) fue confirmado mediante hibridación por Southern blot con una sonda marcada radioactivamente correspondiente al exón 1 del gen *vav3* murino. El clon fue digerido seguidamente con un panel de 10 enzimas de restricción y aquellos conteniendo secuencias correspondientes al exón 1 del gen *vav3* murino fueron subclonados en un vector bacteriano (pZERO-2, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Cinco fragmentos de DNA genómico derivados del BAC #26520 tras digestión con Acc65I, BamHI, EcoRI, EcoRV y HindIII que abarcan un total de 17.5 kilobases del locus de interés fueron subsiguientemente cartografiados mediante digestión con enzimas de restricción e hibridación por Southern blot con la sonda generada por PCR mencionada anteriormente que contenía el exón 1 del gen *vav3* murino. Junto a ello, se realizaron reacciones de secuenciación de los extremos de cada subclón (usando los primers M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', SEQ ID NO3) y M13R (5'-AACAGCTATGACCATG-3', SEQ ID NO4) presentes en el vector p-ZERO-2). Dicha secuenciación permitió establecer dónde estaba localizado del exón 1 del gen *vav3* murino dentro de dichos subclones. Resultó que el exón 1 estaba presente en el subclón Acc65I#1 (secuenciado con el oligonucleótido M13R) y en subclón BamHI#1 (secuenciado con el oligonucleótido M13R). Se trató también de identificar el segundo exón del gen *vav3* usando la misma estrategia. Sin embargo, estos resultados fueron negativos, lo que indicó que la parte del gen *vav3* clonada más arriba constaba de la región promotora, exon 1 y el intrón localizado tras el exón 1 pero ninguna otra secuencia exónica (ver Figura 1) (SEQ ID NO5).

Para generar el vector knockout, se liberó del subclón EcoRI#1 un fragmento de 4.5 kilobases mediante digestión con los enzimas de restricción Acc65I y HindIII. Tras generar extremos romos usando técnicas estándar, el fragmento Acc65I-HindIII se subclonó en el plásmido p38LoxPNeobGHpA (IncyteGenomics, St. Louis, MI, EE.UU.) linealizado con el enzima de restricción SfeI. Este clonaje situó el brazo 5' del constructo delante del gen marcador *neo*^R, el cual está flanqueado por dos regiones LoxP. Además, dicho plásmido contiene la región poliA del gen bovino de la hormona del crecimiento (bGH) detrás del gen marcador *neo*^R (ver Figura 1B para esquema de dicho vector). Estas secuencias exógenas suman, en total, una longitud de 1.5 kilobases. Como consecuencia de la ligación de dicho fragmento, los sitios Acc65I (presente en dicha región del gen *vav3* murino), HindIII (presente en dicha región del gen *vav3* murino) y SfeI (presente en el vector) quedaron destruidos (ver Figura 1). Para generar el brazo 3' del vector knockout, se liberó del subclón HindIII#1 un fragmento de DNA genómico de 4.2 kilobases mediante digestión con los enzimas NruI (presente en el interior del exón 1 del gen *vav3* murino, ver Figura 1) y Ecl136II (está última es una digestión parcial para evitar el corte del fragmento en un sitio Ec136II adicional que se encuentra dentro del subclón HindIII#1). Este fragmento se clonó en el vector knockout que ya contenía el brazo 5' de *vav3* (ver más arriba) para generar el vector knockout definitivo (p38LoxPNeobGHpAIVav3). Como consecuencia de dicha ligación, el sitio NruI (presente en dicha región del gen *vav3* murino), el sitio Ecl136II más distal del fragmento (presente en dicha región del gen *vav3* murino) y el sitio SmaI (presente en el vector) quedaron destruidos (ver Figura 1). Una vez construido, el vector knockout (Figura 1), éste se transformó en la bacteria *E. coli* (cepa DH5 alfa) para su amplificación y purificación posterior mediante técnicas estándar de biología molecular. Después de estos pasos, el vector knockout se utilizó para electroporar células ES de ratón (ver sección siguiente).

1.2. Electroporación e inyección de células madre

La construcción knockout de plásmido purificado (p38LoxPNeobGHpA/Vav3, ver sección anterior) fue linealizada en la región del polylinker del plásmido generando así un brazo más corto y un brazo más largo de la secuencia de *vav3* en cada lado del gen *neo*^R. La construcción knockout linealizada se transfectó en la línea de células madre embrionarias 0101 (IncyteGenomics, Inc., St. Louis, MI, EE.UU) como sigue: se añadieron aproximadamente 5 nmoles de DNA linealizado a aproximadamente 5 x 10⁶ células ES en un volumen de aproximadamente 800 μ l de medio de cultivo. Las células se trataron con pulsos a 0,34 kilovoltios y 250 μ F, tras lo cual cada vial de células se cultivó en dos placas de cultivo de 10 cm revestidas con gelatina al 1% y que contenían células alimentadoras de fibroblasto embrionario en 10 ml de medio DMEM (Gibco/BRL, Grand Island, NY), suero de ternero fetal al 15% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU. o el equivalente de Hyclone Labs, Logan, UT, EE.UU.), y factor de inhibición de leucemia (Fung-Leung *et*

ES 2 318 921 B1

al., Cell, 65:443-449 [1991]). Dos días después, se inició la selección *neo* añadiendo el antibiótico G418 a los cultivos (250 µg/ml). Las células que sobrevivieron en presencia de G418 la mayoría probablemente contenían la construcción knockout. Después estas células se cribaron para verificar que las células habían incorporado la construcción knockout en el DNA genómico. Para el cribado de los clones celulares supervivientes, se aisló el DNA genómico de las células seleccionadas positivamente en presencia del antibiótico G418. Como testigo, se empleó DNA genómico aislado del clon original de células ES que no había sido electroporado. Los DNAs genómicos se digirieron de dos maneras alternativas: (i) con el enzima de restricción BamHI. (ii) con el enzima de restricción EcoRV. Tras la digestión, los DNAs digeridos se transfieren a filtros de nitrocelulosa (Schleicher and Shuel, Keene, NH, EE.UU.) mediante la técnica de Southern y se hibridaron con sondas marcadas radioactivamente que correspondían a fragmentos del DNA genómico que flanqueaban las introducidas en el vector knockout (denominadas sondas 5' y 3', ver Figura 1). En el caso de los DNAs digeridos con BamHI, la sonda usada (sonda 3') correspondía a un fragmento SacI-BamHI de 1.300 pares de bases (bp) del intrón localizado tras el exón 1 del gen *vav3* murino (ver Figura 10). En el caso de los DNAs digeridos con EcoRV, la sonda utilizada (sonda 5') correspondía a un fragmento KpnI de 1.700 bp del gen *vav3* murino que estaba presente antes del brazo 5' usado en la construcción knockout. La sonda 3' debe de reconocer los siguientes fragmentos en el DNA linearizado con BamHI: (i) una banda de 6,0 kbp si el DNA contiene el alelo endógeno (salvaje); (ii) una banda de 7,5 kbp si el DNA contiene el alelo recombinante knockout (ver Figura 1). La sonda 5' debe reconocer los siguientes fragmentos del DNA linearizado con el enzima EcoRV: (i) una banda de 11,7 kbp si el DNA contiene el alelo endógeno (salvaje); (ii) una banda de 8,4 kbp si el DNA contiene el alelo recombinante (knockout, ver Figura 1). Junto a estas sondas, se utilizó también una sonda correspondiente al gen *neo*^R para verificar que existía una única integración del vector knockout en el genoma de las células ES seleccionadas.

Las líneas celulares que contenían el inserto *vav3-neo* que se había insertado en el DNA genómico adecuadamente, se prepararon para inyectarlas en embriones murinos por tratamiento con tripsina siguiendo métodos descritos por Robertson (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C., [1987], Robertson, E.J., ed). Los embriones inyectados eran embriones de 3,5 días obtenidos por perfusión del útero de ratones hembra que se había apareado con ratones macho. Después de inyectar las células madre embrionarias en los embriones, los embriones se implantaron en ratones hembra pseudopreñadas para la gestación. Las crías se aparearon entre ellas o con un ratón con un color de pelaje adecuado para poder detectar los ratones que llevaban la construcción knockout.

1.3. Detección de la construcción knockout en ratones

Se evaluó la presencia de la construcción knockout en las crías de estos apareamientos mediante detección de una transferencia Southern de DNA obtenida de tejido de la cola, con las sondas 5' y 3' descritas antes. Además, se estableció un protocolo para la determinación más rápida del genotipo de los ratones mediante la técnica de PCR. Para eso, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para usar como cebadores en la reacción:

Primer 1 (denominado bGH2): 5'-GCATCGCATTGTCTGAGTAGG-3' (SEQ ID NO6)

Primer 2 (denominado VAV3-KO-3'): 5'-TGAGCAGCTGGCAGAGCAGG-3' (SEQ ID NO7)

Primer 3 (denominado VAV3-KO-5'): 5'-GGACATGGAGCCGTGGAAGC-3' (SEQ ID NO8)

Cuando son usados conjuntamente en reacciones PCR con DNA genómico obtenido de las colas de ratón, estos oligonucleótidos dan lugar a las siguientes bandas diagnósticas: (i) en el caso de ratones salvajes: una única banda de 150 bp; (ii) en el caso de ratones homocigotos: una única banda de 200 bp; (iii) en el caso de ratones heterocigotos: dos bandas de 150 y 200 bp (Figura 2).

Para evaluar el nivel de expresión de la oncoproteína Vav3 en ratones de tipo salvaje y knockout, se obtuvieron usados celulares de la médula ventrolateral presente en el cerebro de estos ratones. Los extractos celulares se obtuvieron por homogenización de fragmentos de tejido en el tampón de lisis [20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), 1 mM NaVO₄ (Sigma-Aldrich), 1 mM NaF (Sigma-Aldrich), 5 mM iodoacetamida (Sigma-Aldrich), y un cocktail de inhibidores de proteasas Cømplete; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, R.F. Alemana)]. Tras la homogenización y la eliminación de material celular insoluble mediante centrifugación, los lisados resultantes se incubaron con un anticuerpo policlonal contra Vav3 durante 2 horas. Tras ello, los anticuerpos fueron inmovilizados usando bolas acopladas a Protein A Sepharose (Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, EE.UU.), lavados con tampón de lisis y, finalmente, separados electroforéticos en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 8%. La proteína Vav3 fue detectada por técnicas estándar de inmunoblot usando anticuerpos específicos contra Vav3.

Alternativamente, la determinación de la expresión de la proteína Vav3 se realizó mediante técnicas inmunocitoquímicas en diversos tejidos de ratones usando anticuerpos específicos contra Vav3. Estos estudios demostraron que la proteína se expresaba exclusivamente en los ratones salvajes pero no en los homocigotos knockout (ver, por ejemplo, la Figura 13A y B)

Ejemplo 2

*Análisis de los efectos del gen vav3 knockout*5 2A. *Presión arterial y frecuencia cardiaca*

Todas las determinaciones hemodinámicas fueron llevadas a cabo en conformidad con las disposiciones nacionales e internacionales sobre uso y cuidado de animales de laboratorio (Consejo de Europa, publicación en el Diario oficial n° L358/6, pág. 8509-8512, 18 de diciembre de 1986; BOE n° 67, pág. 8509-8512, 18 de marzo de 1988; "Guide for the care and use of laboratory animals", NIH publication n° 8523). Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg peso corporal) (Sigma-Aldrich) o, en algunos casos (tratamientos con bicuculina), con uretano (2 mg/kg peso corporal) (Sigma-Aldrich). Dosis adicionales de pentobarbital sódico (10 mg/kg de peso corporal) fueron administradas durante el experimento cuando se necesitó mantener los animales anestesiados. Para medir la presión arterial y el ritmo cardiaco, los ratones fueron sometidos a una traqueotomía. Posteriormente, la arteria carótida derecha fue canulada con un tubo PE-10 conectado a su vez a un tubo PE-50 y, éste, a un transductor de presión para permitir la medición continua de la presión arterial y el ritmo cardiaco. Los valores experimentales fueron recogidos usando un grabador de datos digital (MacLab/4e, AD Instruments, Castle Hill, Australia) y analizados usando el programa informático Chart v3.4. La presión arterial basal (sistólica, diastólica y media) así como el ritmo cardiaco fueron registrados tras un periodo de adaptación de 20 minutos en todos los experimentos.

Como se ve en Figura 3, los ratones *vav3* (-/-) - pero no los *vav3* (+/-) o *vav3* (+/+) - poseen una marcada taquicardia e hipertensión (Figura 4).

25 2B. *Histología de arterias y corazón*

Los corazones y aortas fueron seccionados y fijados en paraformaldehído al 4% en solución salina fisiológica y embebidos en parafina (Termo Electrón Corporation, New-York, NY, EE.UU.). Tras ser cortadas con un microtomo, las secciones (2-3 μ m) fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Las cuantificaciones del número de células en las secciones teñidas fueron realizadas a ciegas utilizando en software Metamorph-Metaview (Universal Imaging Co., West Chester, PA, EE.UU.).

Es evidente que, a partir de los cuatro meses de edad, los ratones *vav3* (-/-) experimentan los siguientes cambios cuando se comparan con los ratones salvajes control: (i) hiperplasia de la media de la aorta (comparar dos primeras líneas). Ésta se debe tanto a un mayor número de células de músculo liso como de fibras de colágeno y elastina; (ii) una desorganización de la media de la aorta, que pierde su estructura estratificada típica; (iii) una hiperplasia del ventrículo izquierdo del corazón (comparar las dos últimas líneas) (Figura 4).

2C. *Determinación de los niveles de actividad de renina y ECA*

Los ensayos cuantitativos de la actividad de la renina en el plasma de ratones fue medida por RIA usando un kit comercial (Ren-CT2) y de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Schering España SA, Madrid, España) (Figura 5A). Brevemente, el ensayo se realiza en 250 μ l de plasma suplementado con 4% EDTA (Sigma-Aldrich) como anticoagulante. El paso principal del ensayo es la generación de angiotensina I marcada con ¹²⁵I durante una incubación a 37°C durante 1.5 horas. Consecuentemente, el principio del ensayo está basado en la competición entre la angiotensina I marcada y la angiotensina I contenida en los testigos o especímenes a ensayar por un número fijo y limitado de sitios de unión del anticuerpo contra angiotensina I. La radioactividad es medida con un contador de centelleo gamma. Estos ensayos indicaron que la actividad de la renina estaban elevados en los ratones *vav3* (-/-) (Figura 5A).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) se determinó mediante el uso del tripéptido Hippurly-His-Leu (Chevallard *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 148: 79-91 [1998], Chevallard *et al.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 14:297-301 [1999]). La proteasa ECA puede cortar dicho tripéptido, tras lo cual el producto de la reacción (Hippurly-His) puede ser cuantificado mediante métodos espectrofluorimétricos utilizando o-ftalaldehído. Para realizar estos análisis, los corazones de ratones de los genotipos adecuados se homogenizaron en presencia de 50 mM KPO₄. Tras la eliminación del material insoluble, se tomaron 100 μ l del lisado (conteniendo un total de 20 mg de extracto proteico), añadiéndoseles seguidamente 50 μ l de agua y 100 μ l de Hippurly-His-Leu 1.5 M (Sigma-Aldrich). Tras una incubación a 37°C durante 10 min, las reacciones se pararon por la adición de 1,45 ml de 280 mM NaOH. Seguidamente, la reacción de fluorescencia se realizó mediante la adición de 100 μ l de o-ftalaldehído al 1% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en la oscuridad, tras lo cual se añadieron 200 μ l de 3N HCl durante 30 minutos para permitir la liberación de fluorescencia. La intensidad de ésta en la longitud de onda de 486 nm fue determinada mediante un fluorímetro convencional (Perkin Elmer). Estos ensayos permitieron descubrir que la actividad de la ECA estaba elevada en los ratones *vav3* (-/-) (Figura 5B).

65 2D. *Determinación de los niveles plasmáticos de angiotensina II y bradiquinina*

La concentración de la angiotensina II en plasma se determinó por ELISA usando el kit Angiotensin II Enzyme Immunoassay (SPI, Bio, Massy, Francia), exactamente como se indica en el protocolo de la empresa suministradora. Para ello, se recogieron muestras de sangre de cada ratón en tubos conteniendo 4% EDTA (Sigma-Aldrich). Tras ello,

ES 2 318 921 B1

100 μ l del plasma de cada ratón se incubaron independientemente en placas cubiertas con un anticuerpo monoclonal contra la angiotensina II. Tras ser lavados y sometidos a un tratamiento desnaturalizante, la angiotensina II se hizo reaccionar con un anticuerpo monoclonal contra la angiotensina II marcado con acetilconinesterasa para inducir una reacción colorimétrica. La intensidad del color se determinó seguidamente por espectrometría (entre 405 y 414 nm).

5

La concentración de la bradiquinina en plasma de ratones se analizó utilizando un kit de RIA comercial de acuerdo con el protocolo del fabricante (Markit-M Bradykinin, Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan). En cada muestra se emplearon 200 μ l de plasma.

Estos protocolos permitieron descubrir, entre otras cosas, que los niveles de angiotensina II y bradiquinina estaban elevados desde el nacimiento en los ratones *vav3* (-/-) (Figuras 5D y 5E, respectivamente). También permitieron ver que el tratamiento con captopril bloqueaba el incremento de angiotensina II en los ratones *vav3* (-/-) (Figura 7B). También se producía dicho bloqueo tras el tratamiento de ratones *vav3* (-/-) con propranolol (Figura 11C).

15 2E. Determinación de niveles de expresión de receptores AT₁ para la angiotensina II

La cuantificación de los niveles de expresión de los RNA mensajeros para los receptores AT₁ de la angiotensina II se realizó mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Para ello, se utilizó inicialmente el reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD, EE.UU.) para obtener los RNA totales de corazón, aorta, y arteria pulmonar de los diferentes ratones. La retrotranscripción y PCR cuantitativa se llevó a cabo consecutivamente usando el kit Quantitec SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Hilden, Germany). La amplificación en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con dos cebadores de oligonucleótidos específicos para los receptores AT₁:

AT1-F: 5'-AAAGGCCAAGTCGCACTCAAG-3' (SEQ ID NO9)

25

AT1-R: 5'ATTTAGTCCGATGCTG000TG-3' (SEQ ID NO10)

y el termociclador iCycler iQ (BioRad, Manchen, R.F. Alemana) usando el intercalador SybrGreen como marcador fluorescente. Las amplificaciones fueron evaluadas utilizando el "iCycler iQ Real Time Detection System software" (BioRad). Como testigo para permitir la normalización de resultados entre las diferentes muestras, se usó en paralelo una RT-PCR cuantitativa en tiempo real del RNA mensajero que codifica para la proteína p36b4. En este caso, los cebadores usados en la PCR fueron el p36b4-F (5'-GTGTTTGACAACGGCAGCATT-3') (SEQ ID NO11) y el p36b4-R: 5'-TTGATGATGGAGTGT GGCACC-3') (SEQ ID NO12). Estas técnicas permitieron demostrar que el mRNA para los receptores AT₁ estaban incrementados en la aorta y el corazón de los ratones *vav3* (-/-) (Figura 5C).

35

2F. Cuantificación de los efectos de losartán

El inhibidor losartán (DUP 153), un antagonista de la angiotensina II que bloquea su interacción con los receptores de tipo AT₁, fue obtenido de DuPont (Willmington, DE, EE.UU.), disuelto en solución salina fisiológica, y suministrado a los ratones en una dosis sencilla (10 mg/kg de peso corporal) a través de un catéter introducido en la vena yugular izquierda de cada ratón. El losartán fue suministrado como un bolo, usando intervalos de tiempo entre las inyecciones de suficiente extensión para permitir el retorno de la presión arterial a niveles basales. La presión arterial se determinó como en la Sección 4A. Se aprecia que el tratamiento con losartán produce una rápida disminución de la presión arterial media (expresada en milímetros de mercurio) tanto en los ratones salvajes como homocigotos knockout (Figura 6).

45

2G. Cuantificación de los efectos del captopril y propranolol

Ratones de tres meses de edad fueron mantenidos en el animalario con agua de beber que contenía o carecía del inhibidor captopril (Sigma-Aldrich, concentración 100 μ g/ml). El captopril es una molécula que inhibe la actividad del enzima ECA (ver Figura 6A). Tras un periodo de 5 semanas, la presión arterial y ritmo cardiaco fueron determinados como se indica en la Sección 4A. Alternativamente, los ratones fueron sacrificados, tras lo cual su plasma fue utilizado para determinar la concentración de angiotensina II (ver Sección 4A) y estudios histológicos con secciones de corazón y aorta (ver Sección 4B). El mismo esquema experimental fue seguido en los tratamientos con propranolol (Sigma-Aldrich). Éste se suministró vía oral usando una concentración en el agua de beber de los ratones de 0,5 μ g/ml.

50

55

En la Figura 7 se aprecia que el tratamiento con captopril inhibe la enfermedad cardiovascular típica de los ratones *vav3* (-/-), tal como se ve en los niveles bajos de presión arterial (A) y de angiotensina II (B) así como en las histologías normales de sus aortas y corazones (C). En resumen, los efectos del losartán (Figura 6B) y captopril (Figura 7) sobre la enfermedad cardiovascular de los ratones *vav3* (-/-) confirma que la desregulación de la ruta de la angiotensina II está detrás de dicha patología.

60

El propranolol es una molécula antagonista de los receptores beta-adrenérgicos, por lo que bloquea la acción de las catecolaminas producidas por el sistema nervioso simpático. El tratamiento con propranolol bloquea la aparición de la hipertrofia de la aorta (paneles inferiores) y del ventrículo izquierdo del corazón característico (paneles superiores) de los ratones *vav3* (-/-). (Figura 11D).

65

ES 2 318 921 B1

2H. Cuantificación de los niveles de catecolaminas en plasma

Los niveles de noradrenalina, adrenalina y dopamina en el plasma de ratones fueron determinados por ELISA (noradrenalina y adrenalina) o RIA (dopamina) usando un kit comercial (CatCombi ELISA, IBL-Hamburg, R.F. Alemana). El uso de estas técnicas permitió observar que los niveles de estas tres catecolaminas estaban elevadas en los ratones *vav3* (-/-) desde el nacimiento (ver Figura 8). También sirvieron para demostrar que la bicuculina no induce efectos apreciables en los niveles de catecolaminas en los ratones *vav3* (-/-) pero sí en los ratones *vav3* (+/+) (ver Figura 12C).

2I. Detección de niveles de tirosín hidroxilasa (TH) en tejidos de ratones

La TH es un marcador específico del sistema nervioso simpático, siendo el enzima que cataliza el paso limitante de la producción de catecolaminas en dichas células. Secciones de tejidos obtenidos según lo indicado en la Sección 4B fueron analizadas por técnicas inmunocitoquímicas estándar utilizando anticuerpos de conejo contra la tirosín hidroxilasa (dilución 1:100; Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.). Tras una incubación a 4°C durante 48 horas, las secciones fueron lavadas con TBS-T (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 0.1% Tween) e incubadas con leche en polvo descremada resuspendida en TBS-T y suplementada con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo acoplado a la peroxidasa de rábano (1:200, Amersham Biosciences Co.). Tras una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las secciones se lavaron y trataron con daminobenzida (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Tras la reacción, las secciones fueron lavadas otra vez, teñidas con hematoxilina-eosina, y cubiertas con cubreobjetos para su visualización por microscopía.

Las áreas que se estudiaron usando esta técnica fueron la médula de la glándula adrenal, cortes de cerebro y zonas del cerebro como el bulbo olfatorio, fibras simpáticas, y el área tegmental ventral. En todas ellas puede verse un aumento de los niveles de TH en los ratones *vav3* (-/-) cuando se comparan con zonas similares procedentes de ratones *vav3* (+/+) (Figura 9).

2J. Cuantificación de los efectos de la bicuculina, GYKI y noradrenalina

Se determinaron los efectos de la bicuculina (un inhibidor de las sinapsis inhibitorias GABAérgicas), de la noradrenalina y el GYKI52466 (un inhibidor de las sinapsis estimuladoras de glutamato) sobre la presión arterial de los ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) (Figura 12). Para ello, la vena yugular izquierda de los ratones en estudio fueron cateterizadas para la administración de la bicuculina (Sigma-Aldrich), del GYKI52466 (Sigma-Aldrich) y de la noradrenalina (Sigma-Aldrich). Estas sustancias fueron suministradas como un bolo, usando intervalos de tiempo entre las inyecciones de suficiente extensión para permitir el retorno de la presión arterial a niveles basales. La bicuculina, el GYM 52466 y la noradrenalina fueron disueltas en solución salina fisiológica y suministradas en una dosis única usando 10 mg/kg de peso corporal (en el caso de la bicuculina y GYKI52466) o 10 µg/kg de peso corporal (en el caso de la noradrenalina). La presión arterial y ritmo cardiaco se evaluaron según lo indicado en la Sección 4A. Usando estas técnicas se apreció que los ratones *vav3* (-/-), contrariamente a lo visto con los ratones *vav3* (+/+) control, no responden adecuadamente al tratamiento con la bicuculina (Figura 12A-C). En cambio los ratones *vav3* como los *vav3* (+/+), sí responden adecuadamente tras la adición de adrenalina (Figura 12A,D). El inhibidor GYKI52466 no ejerció efectos detectables independientemente del genotipo del ratón estudiado (Figura 12D).

2K. Detección por inmunohistoquímica y por western blot de los niveles de expresión de GAD65, GAT-1 y Vav3 en sinapsis inhibitorias GABAérgicas de la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (+/+) y *vav3* (-/-) (Figura 13)

Para la detección de las proteínas por técnicas inmunohistoquímicas, secciones histológicas procedentes de médulas ventrolaterales de ratones de cada genotipo y de cuatro meses de edad fueron preparadas como se ha descrito previamente (Secciones 4B and 4I). Tras ello, fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo contra GAD65 (dilución 1:200, Chemicon) y GAT-1 (dilución 1:200, Chemicon). En el caso de la detección de Vav3, se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo generados en el propio laboratorio que reconocen a la proteína Vav3 y no a sus proteínas relacionadas (Vav y Vav2). En este caso, las incubaciones fueron realizadas durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección de proteínas por inmunoblot, las médulas ventrolaterales de ratones de 4 meses de edad de los genotipos adecuados fueron disectadas en solución salina fisiológica y homogenizadas en un tampón de lisis que contenía 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,2), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM ditiotritol, y un cóctel de inhibidores de proteasas (Cøplete, Roche Molecular Biochemicals). Tras la estimación de la concentración de proteínas por el método BioRad Protein Assay (BioRad), cantidades iguales de proteína fueron cargadas en pocillos independientes de un gel de poliacrilamida-SDS al 8%. Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) y se incubaron con los anticuerpos discutidos en esta sección y precedentes. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante anticuerpos contra IgG de conejo conjugados a la peroxidasa de rábano (dilución 1:5000), utilizando un kit comercial de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences Co.).

El uso de estas técnicas permitió demostrar, por un lado, que los niveles de TH estaban incrementados en la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (-/-) (Figura 13A,B). Además, se observó una disminución en los niveles de GAD65 y GAT-1 en la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (-/-) (Figura 13A,B), indicando que las sinapsis inhibitorias

ES 2 318 921 B1

GABAérgicas no se han formado adecuadamente. Finalmente, el uso de estas técnicas permitió verificar la ausencia de expresión del gen *vav3* en los ratones knockout (Figura 13A,B).

5 2L. *Microscopía electrónica de la médula ventrolateral y evaluación del número de sinápsis simétricas y asimétricas presentes en las neuromas simpáticas*

Las médulas ventrolaterales de ratones de cuatro meses de edad fueron disectadas en un tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4) suplementado con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% y glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 1%. Las muestras fueron cortadas seguidamente con un ultratomo Ultracut E (Reichert-Jung LEICA, Orleand, PA, EE.UU.) y fijadas en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.4) conteniendo tetróxido de osmio al 1%. Las secciones fueron deshidratadas mediante pases secuenciales en soluciones de acetona (Merck, Whitehouse Station, NJ, EE.UU.) a 30, 50, 70, 80 y 100% y embebidos en una resina de Araldita-Durcupan (Sigma-Aldrich). Se usaron secciones semifinal para identificar la localización y orientación de los tejidos. Finalmente, secciones ultrafinas fueron cortadas y teñidas con acetato de uranilo (Emscope, Urbana, IL, EE.UU.) y citrato de plomo (Merck, Whitehouse Station, NJ, EE.UU.). Una vez obtenidas las micrografías electrónicas, el número total de sinópsis simétricas y asiméticas fue determinado de visu sin conocer previamente el genotipo del ratón de cada muestra. El uso de estas técnicas permitió demostrar que las sinópsis simétricas GABAérgicas estaban disminuidas en la médula ventrolateral de los ratones *vav3* (-/-) (Figura 14).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 318 921 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mamífero no humano knockout útil como modelo experimental **caracterizado** porque su genoma posee el gen *vav3* mutado.
2. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un ratón knockout mutante deficiente en la proteína Vav3 endógena.
- 10 3. Mamífero no humano según la reivindicación 2 **caracterizado** porque es un ratón que contiene una delección dentro de la región 5' del gen *vav3* (zona promotora y parte de exón 1 (SEQ ID NO5) que conlleva la inactivación del gen *vav3* endógeno y al ausencia de expresión de la proteína codificada por éste.
- 15 4. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un mutante heterocigoto para la mutación *vav3*.
5. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un mutante homocigoto para la mutación *vav3*.
- 20 6. Procedimiento de obtención del mamífero no humano según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizado** porque permite la anulación funcional de la proteína Vav3 en las células germinales y/o somáticas de dicho animal y porque se realiza por recombinación homóloga del gen *vav3* que comprende las siguientes etapas:
- 25 a) elaboración de una construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* con selección positiva que comprende unas regiones de homología con sendas secuencias de nucleótidos presentes en dicho gen *vav3* endógeno,
 - b) transformación de una célula con la construcción knockout de a),
 - 30 c) selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva, y
 - d) las células con la construcción insertada se introducen en embriones que posteriormente son implantados en hembras receptoras para su adecuada gestación, dejándose que se desarrollen a término seguidamente.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* de a) es una secuencia de ácido nucleico que comprende:
- (i) una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3*,
 - 40 (ii) una secuencia marcadora empleada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula transfectada, y
 - (iii) la presencia de "brazos" con secuencias nucleotídicas idénticas al gen endógeno con el fin de facilitar la recombinación homóloga del vector knockout con el gen endógeno.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de (i) comprende:
- a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen *vav3*,
 - 50 b) una secuencia promotora total o parcial del gen *vav3*,
 - c) cualquiera de sus combinaciones, o
 - 55 d) una secuencia de cDNA de *vav3*.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de la construcción knockout de (i) es una cualquiera de las formas homólogas del gen *vav3* existentes en un mamífero no humano
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la célula transformada de b) es una célula madre embrionaria (ES).
- 65 11. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* murino (i) de la construcción knockout *vav3* de a) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO5, aislada del ratón 129 SvJ, constituida por una parte de la secuencia de nucleótidos del promotor, el exón 1 y parte del intrón 1 del gen *vav3* murino y porque la célula transformada de b) es una celular embrionaria (ES) de ratón.

ES 2 318 921 B1

12. Construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* **caracterizada** porque es una secuencia de ácido nucleico diseñada para disminuir o suprimir la expresión de la proteína *vav3* codificada por secuencias de DNA endógeno en una célula y comprende:

- 5 (i) una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3*,
- (ii) una secuencia marcadora empleada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula transfectada, y
- 10 (iii) la presencia de “brazos” con secuencias nucleotídicas idénticas al gen endógeno con el fin de facilitar la recombinación homóloga del vector knockout con el gen endógeno.

13. Construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* según la reivindicación 12 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* (i) comprende:

- 15 a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen *vav3*,
- b) una secuencia promotora total o parcial del gen *vav3*,
- 20 c) cualquiera de sus combinaciones, o
- d) una secuencia de cDNA de *vav3*.

14. Construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* según la reivindicación 13 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* de la construcción knockout de (i) es una cualquiera de las formas homólogas del gen *vav3* existentes en un mamífero no humano.

15. Construcción knockout de recombinación homóloga *vav3* según la reivindicación 12 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *vav3* (i) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO5 que está constituida por una parte de la secuencia de nucleótidos del promotor, el exón 1 y parte del intrón 1 del gen *vav3* murino.

16. Vector de clonación, **caracterizado** porque comprende la construcción knockout *vav3* según las reivindicaciones 12 a la 15.

17. Célula eucariota no humana mutada **caracterizada** porque presenta una disrupción del gen *vav3* endógeno y una deficiencia, parcial o total, en la expresión de la proteína Vav3.

18. Célula eucariota según la reivindicación 17 **caracterizada** porque es una célula pluripotente indiferenciada establecida a partir de la masa interna celular de un embrión knockout en la fase preimplantatoria denominada blastocisto.

19. Célula eucariota según la reivindicación 17 **caracterizada** porque es una célula diferenciada.

20. Célula eucariota según la reivindicación 19 **caracterizada** porque la célula diferenciada es aislada a partir de un mamífero knockout no humano según las reivindicaciones 1 a la 5.

21. Célula eucariota según la reivindicación 20 **caracterizada** porque la célula diferenciada proviene de una línea celular.

22. Célula eucariota según las reivindicaciones 19 a la 21 **caracterizada** porque es una célula diferenciada perteneciente a una estirpe del siguiente grupo: células del sistema nervioso y del sistema cardiovascular.

23. Célula eucariota según las reivindicaciones 17 a la 22 **caracterizada** porque es heterocigota u homocigota.

24. Procedimiento de obtención de la célula eucariota según las reivindicaciones 17 a la 23 **caracterizado** porque es un procedimiento de transgénesis de anulación de la actividad funcional del gen *vav3* que comprende la transformación de dicha célula eucariota mediante la introducción de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen *vav3* capaz de anular su actividad biológica, seleccionándose dicho elemento inhibidor entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Vav3,
- 65 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Vav3,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Vav3, y

ES 2 318 921 B1

d) un RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico del mRNA de la proteína Vav3.

25. Empleo del mamífero no humano según la reivindicación 1 a la 5 ó de la célula según la reivindicación 17 a la 23 en un procedimiento para determinar el efecto de un fármaco o combinación de fármacos útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos derivados de la deficiencia de la proteína Vav3.

26. Empleo según la reivindicación 25 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) administración del fármaco o fármacos en forma y dosis adecuada al animal knockout no humano de la invención o a la célula knockout no humano de la invención *in vitro*, y

b) determinación de su efecto sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav3.

27. Empleo según la reivindicación 25 **caracterizado** porque los fármacos son útiles para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad perteneciente al siguiente grupo: hipertensión esencial o de base genética, hiperplasia cardíaca o arterial, procesos nerviosos, como por ejemplo la enfermedad de Parkinson, procesos neurodegenerativos motores, y esquizofrenia.

28. Empleo según la reivindicación 26 **caracterizado** porque la determinación del efecto de los fármacos ensayados b) se realiza sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav3 perteneciente al siguiente grupo: niveles de presión arterial, ritmo cardíaco, histología del sistema nervioso y cardiovascular, niveles de moléculas reguladoras del estado cardiovascular (por ejemplo, angiotensina II, bradiquinina, así como sus reguladores biosintéticos y receptores), de neurotransmisores del sistema nervioso simpático (diversos tipos de catecolaminas), de moléculas que intervienen en la regulación del sistema nervioso simpático (por ejemplo, GAD65, GAT1, TH, GABA, glutamato) y cardiovascular (marcadores intracelulares, transmembranarias y extracelulares producidas por las células vasculares del músculo liso).

29. Empleo según la reivindicación 25 **caracterizado** porque el animal es un roedor o un primate no humano.

30. Empleo según la reivindicación 25 **caracterizado** porque la línea celular es una línea derivada del sistema nervioso y/o cardiovascular.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

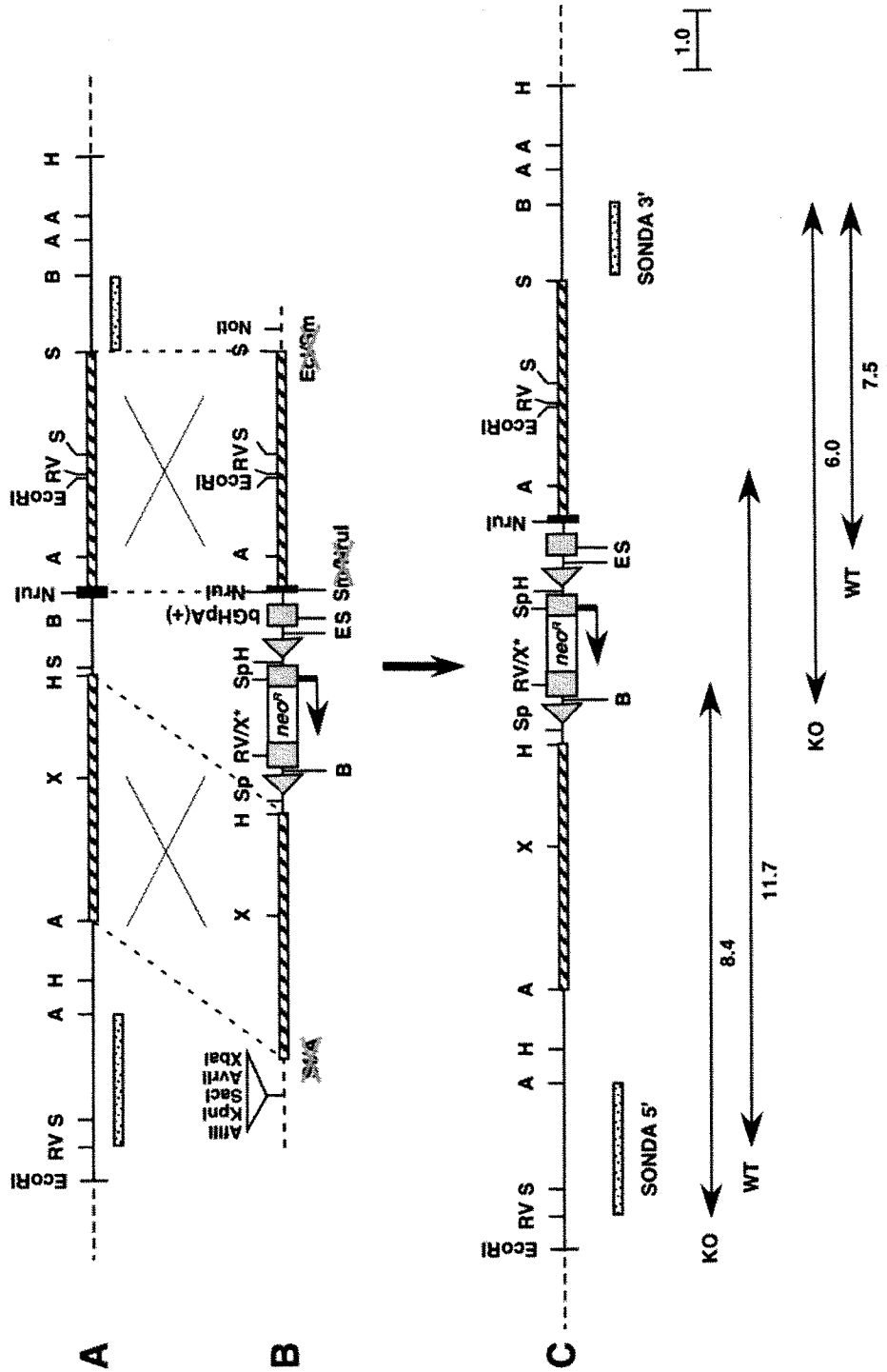


FIG. 2

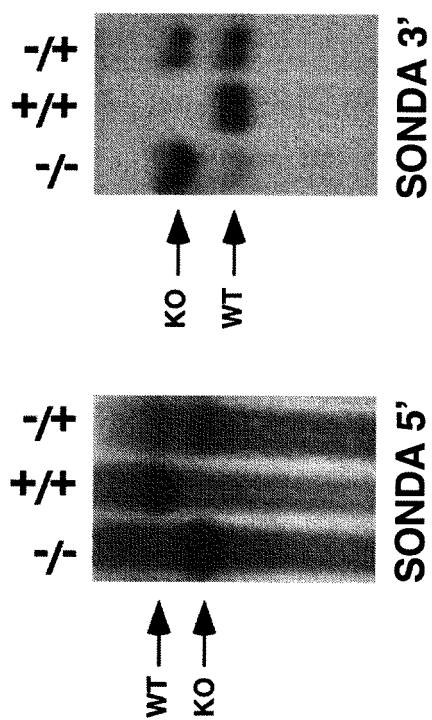


FIG. 3

	<i>WT</i>	<i>vav3 (+/-)</i>	<i>vav3 (-/-)</i>
Peso corporal (g)	27.4 ± 1.4	30.01 ± 0.91	31.25 ± 0.94
Frec. cardiaca (latidos/min)	337 ± 16	334 ± 11	580 ± 24*
PAS (mmHg)	86.7 ± 3.8	86.8 ± 1.4	110.5 ± 3.8*
PAD (mmHg)	61.5 ± 3.7	59.2 ± 3.4	79.6 ± 2.9*
PAM (mmHg)	69.9 ± 3.4	68.4 ± 2.7	90.0 ± 3.8*

FIG. 4

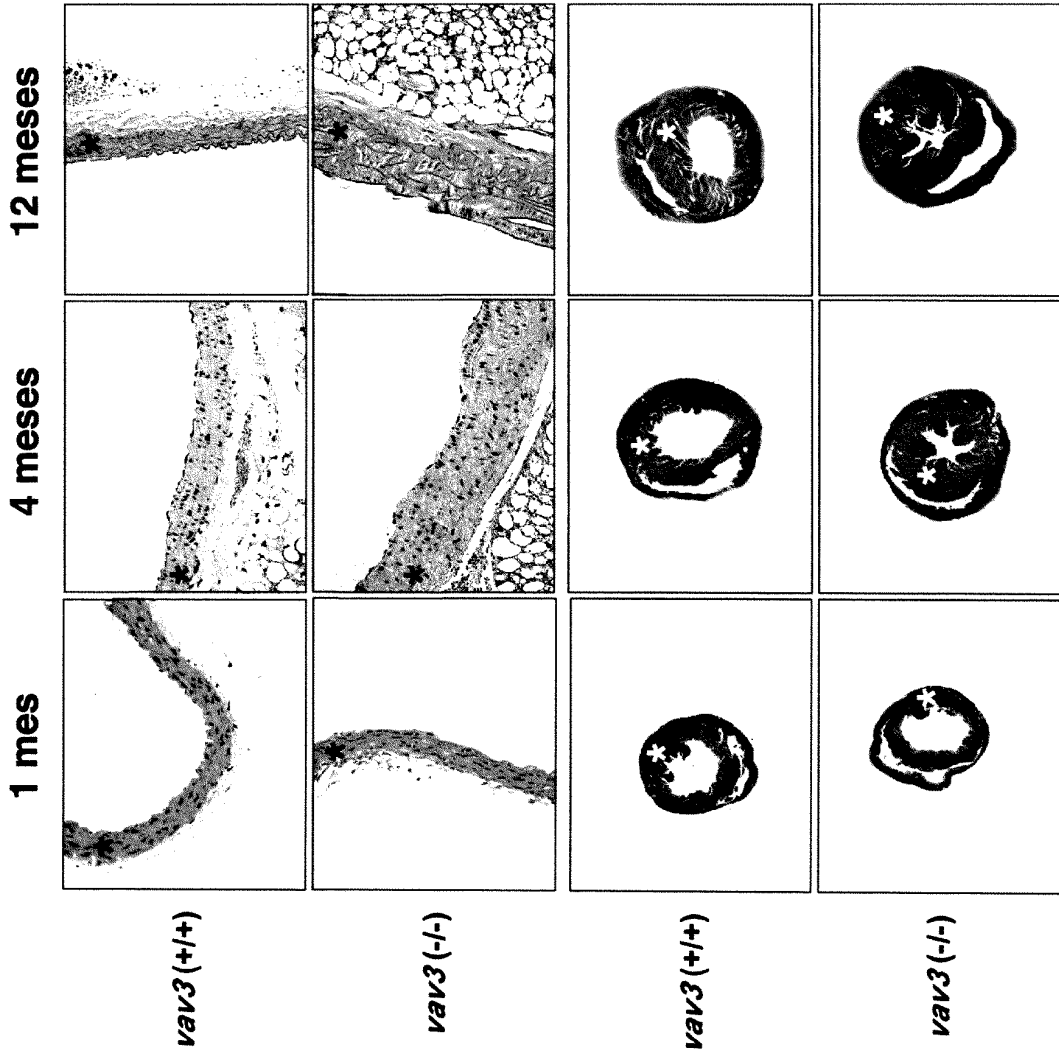


FIG. 5

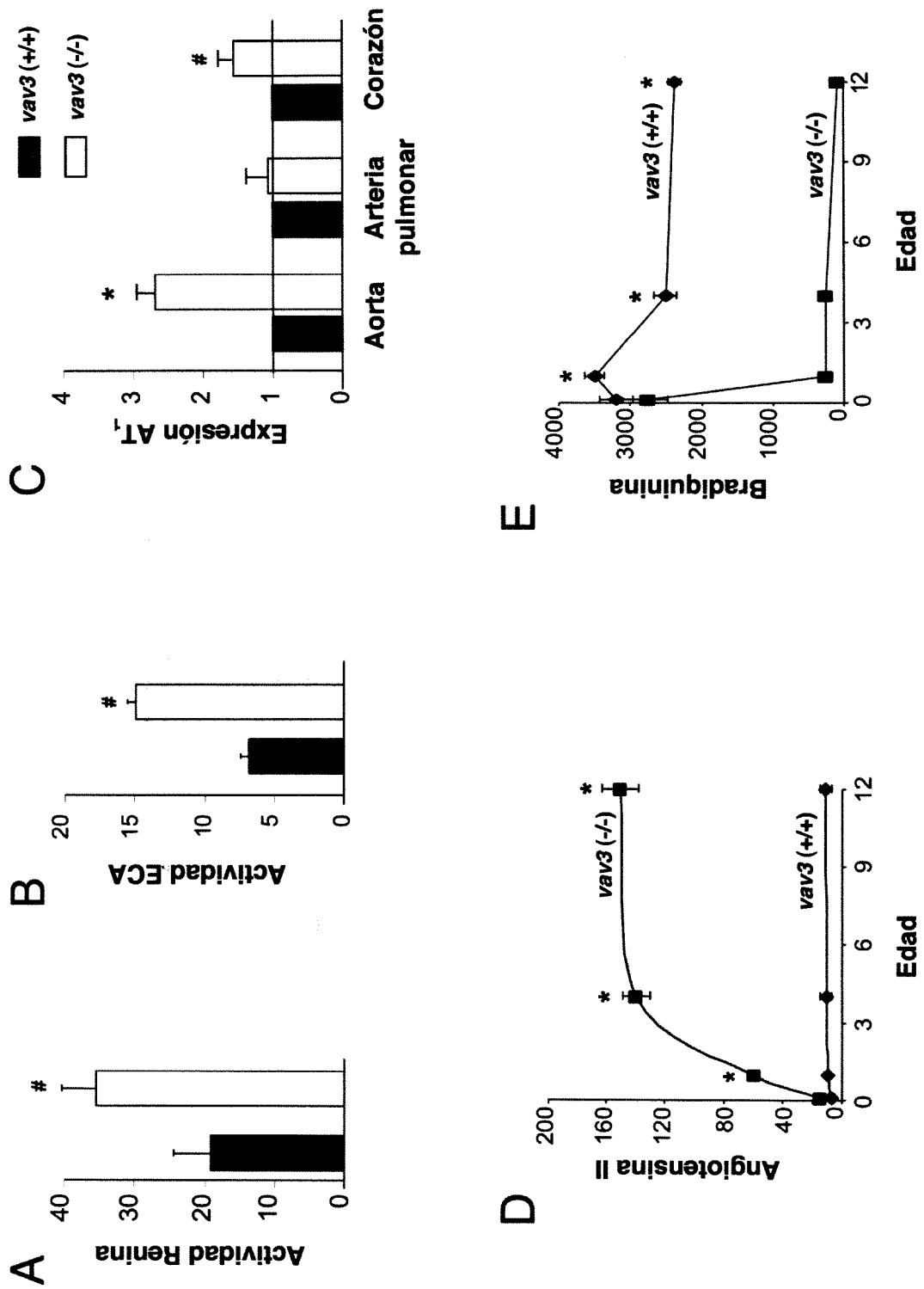


FIG. 6

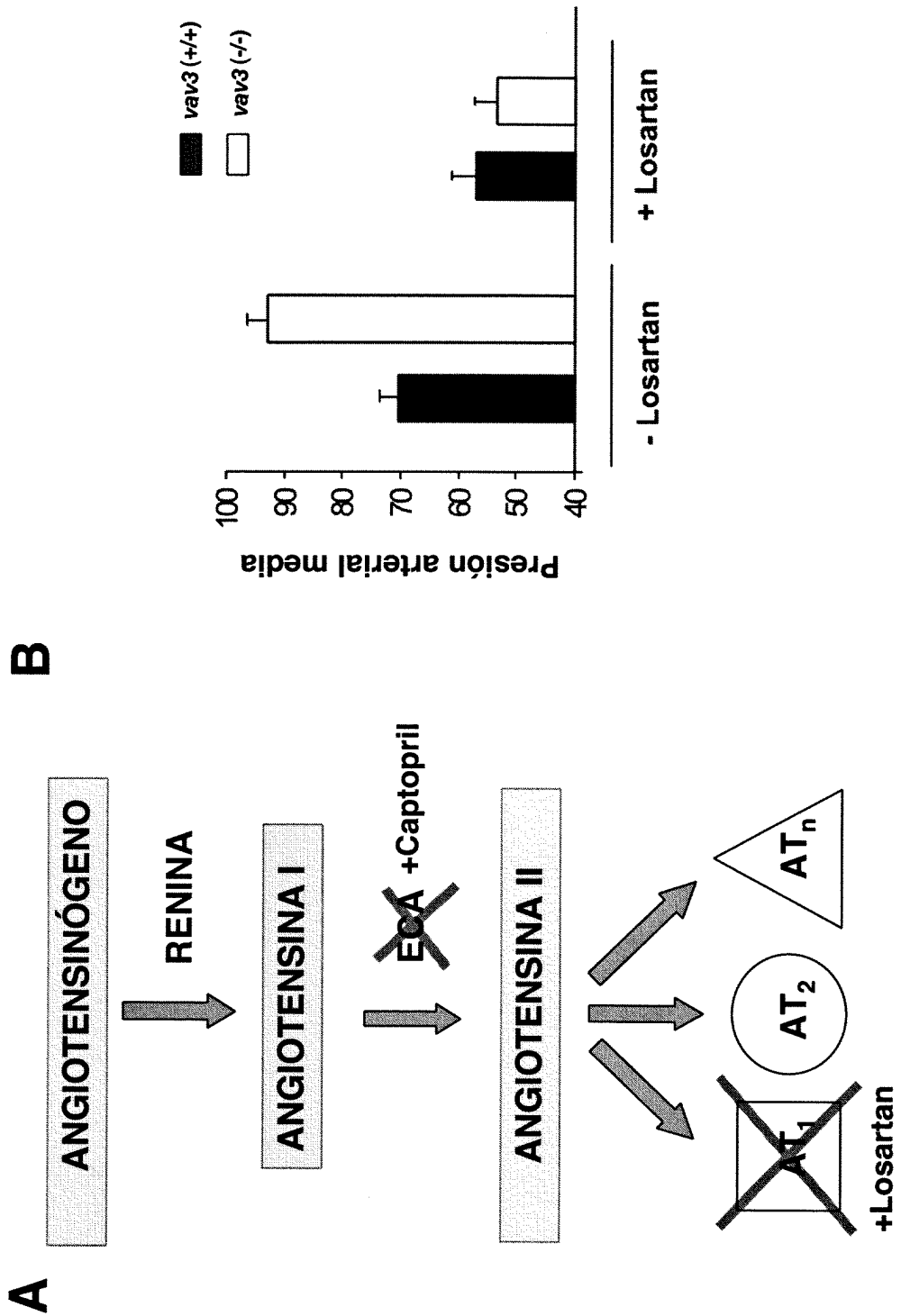


FIG. 7

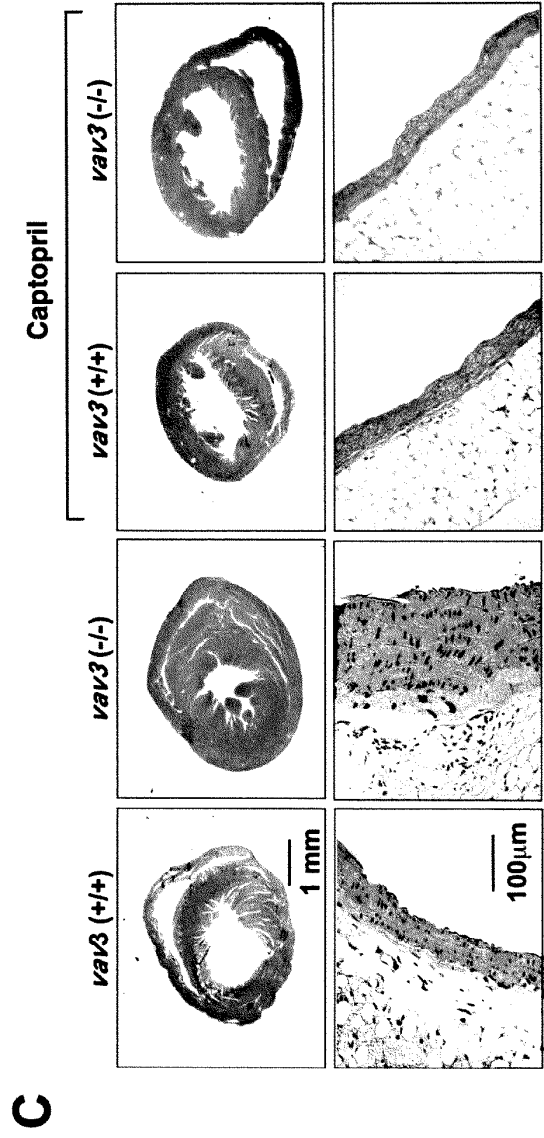
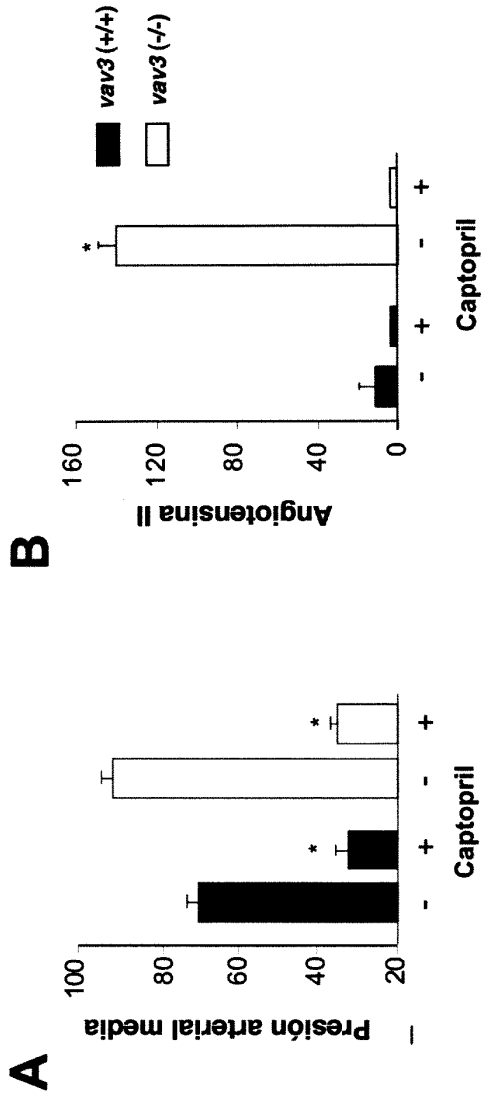


FIG. 8

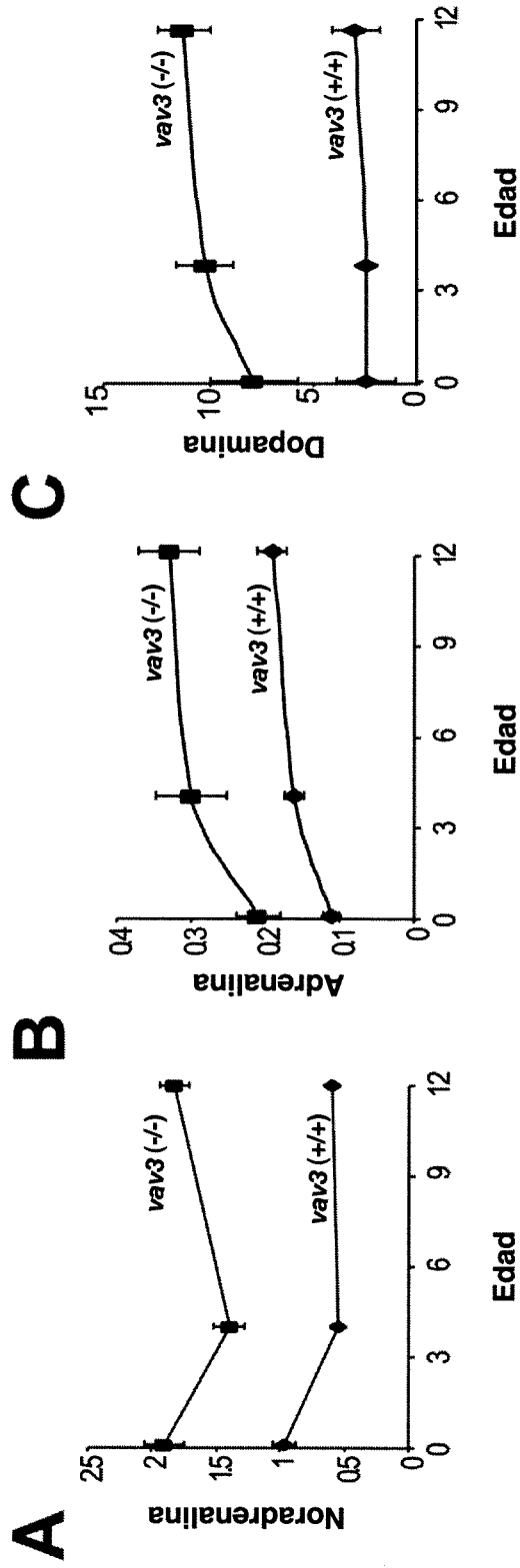


FIG. 9

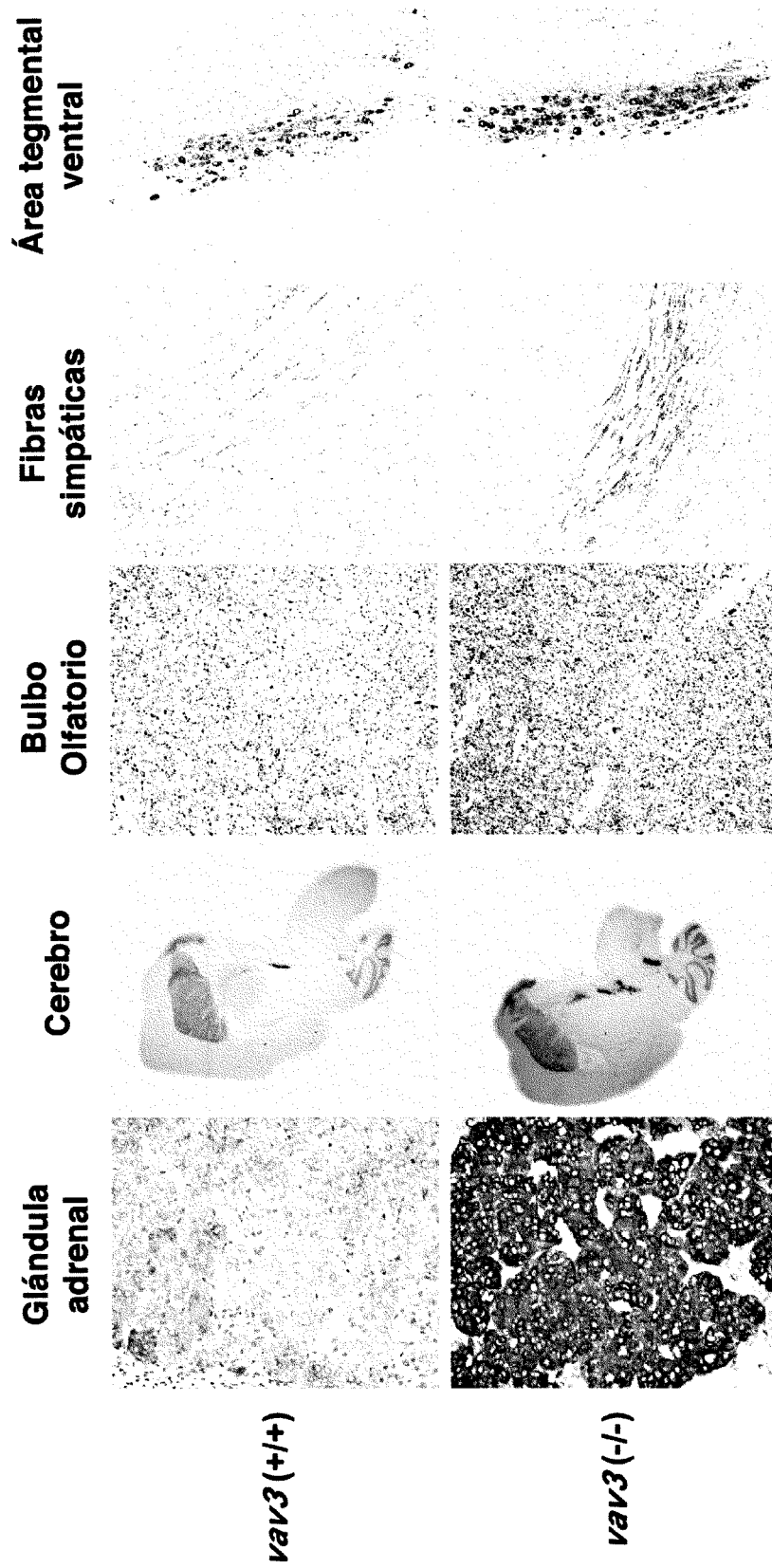


FIG. 10

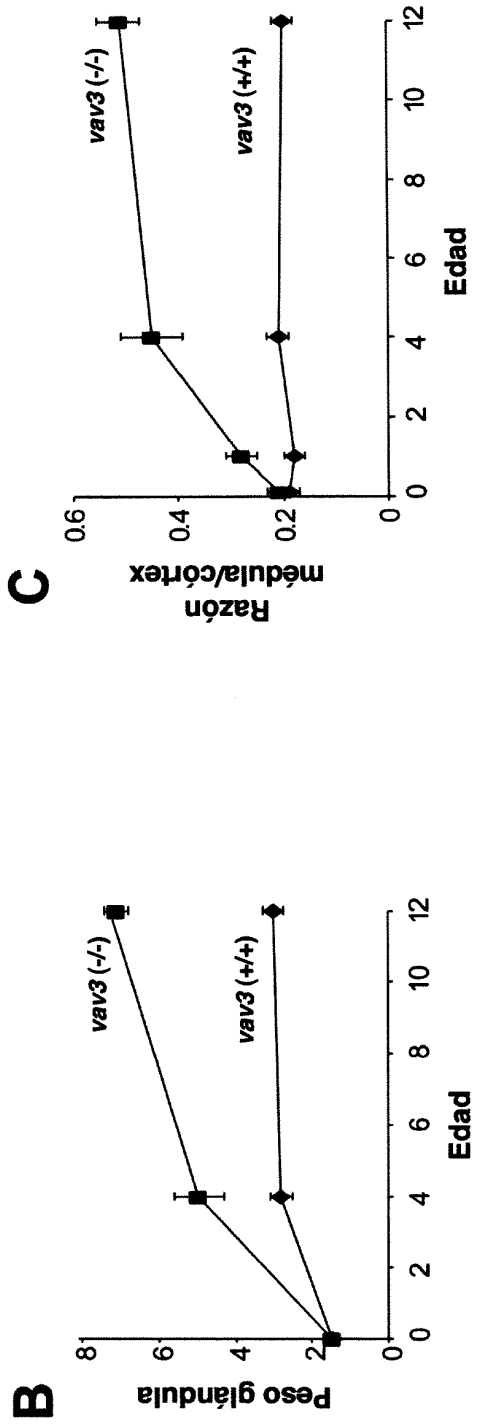
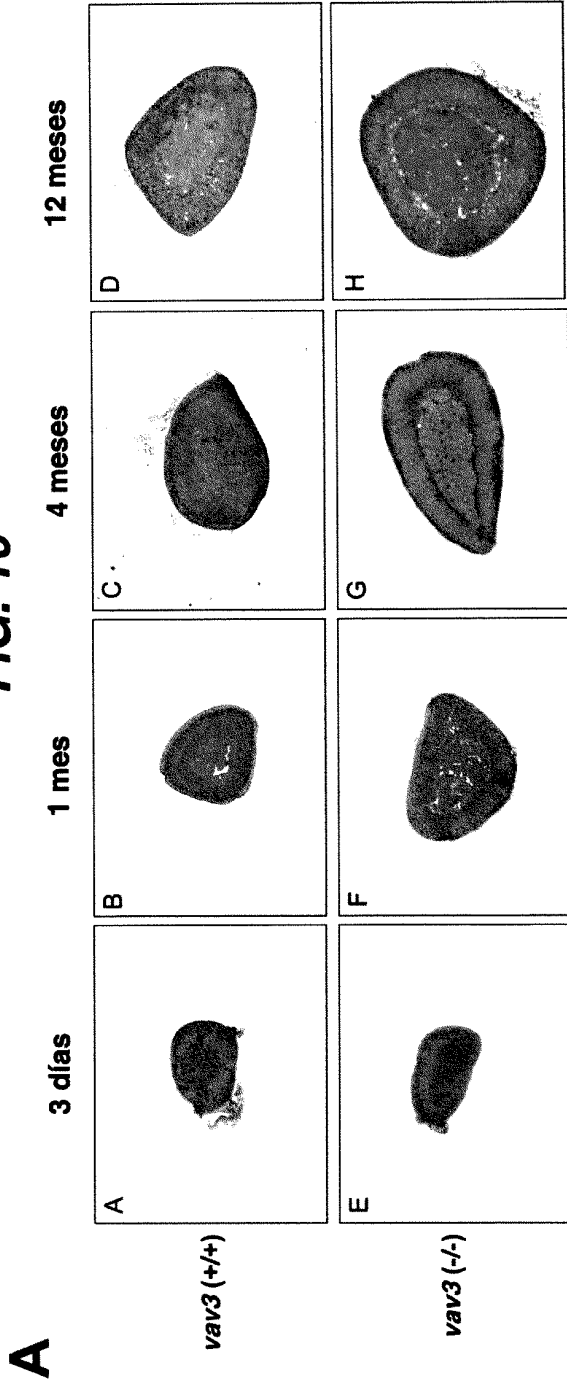


FIG. 11

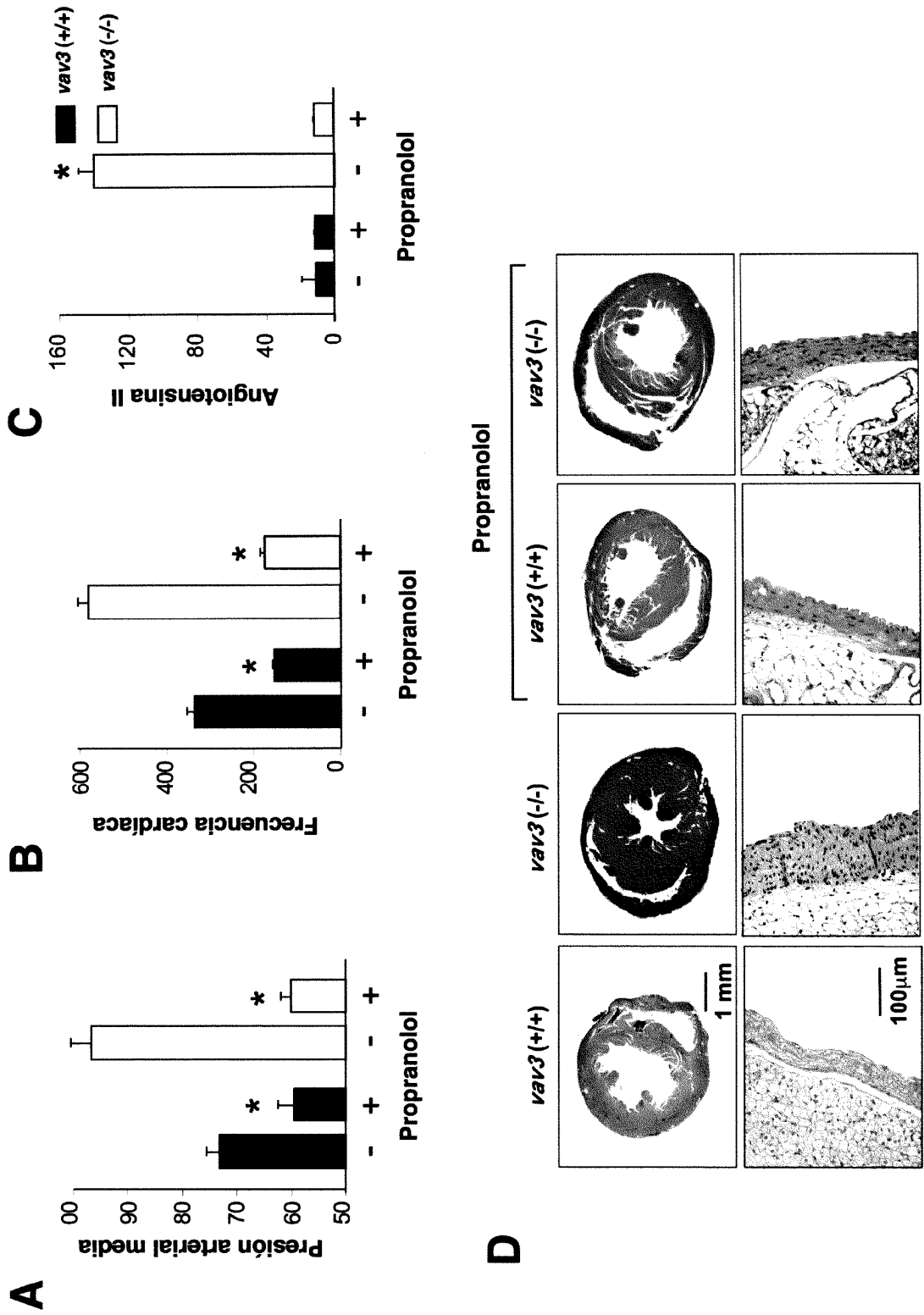


FIG. 12

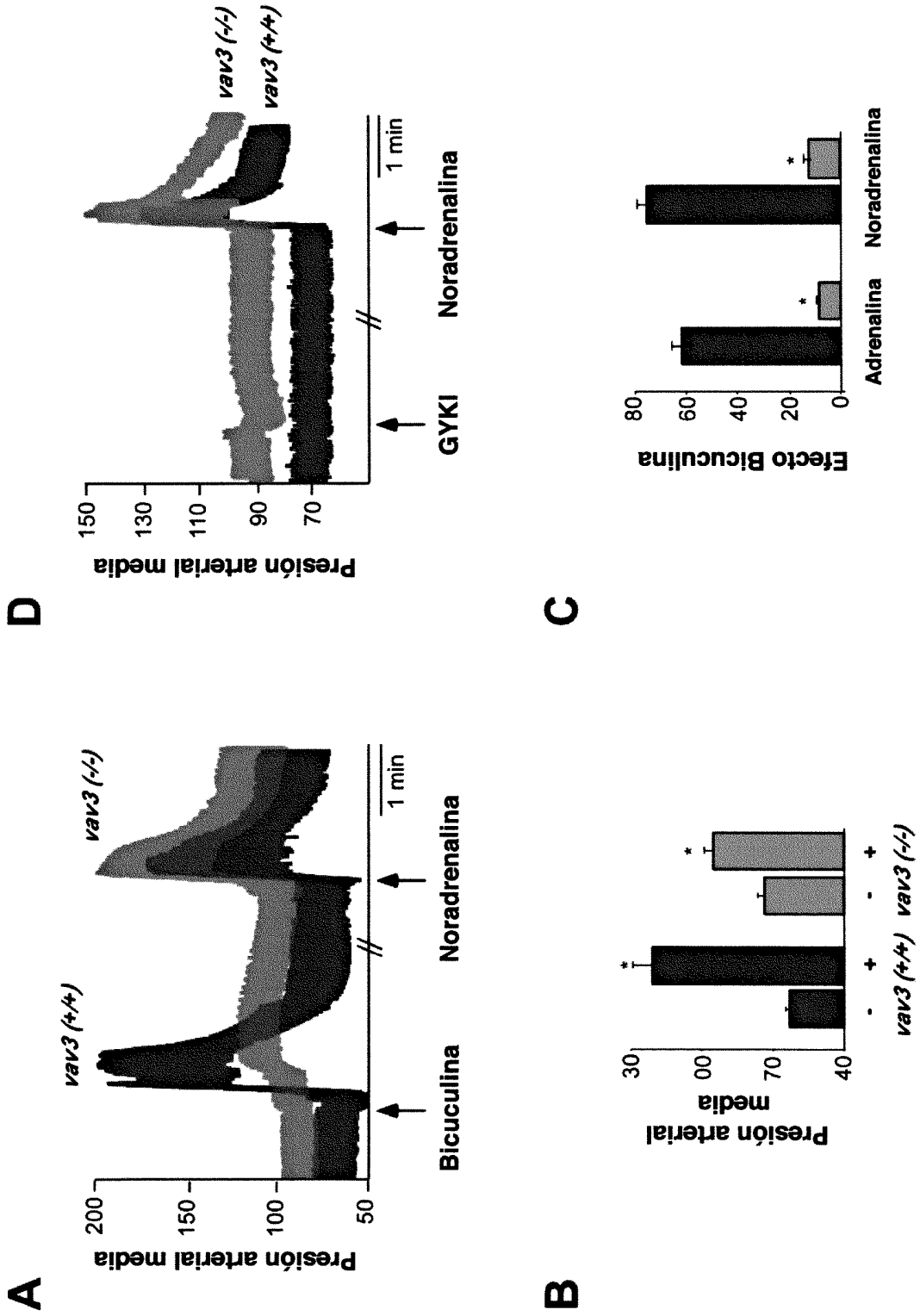


FIG. 13

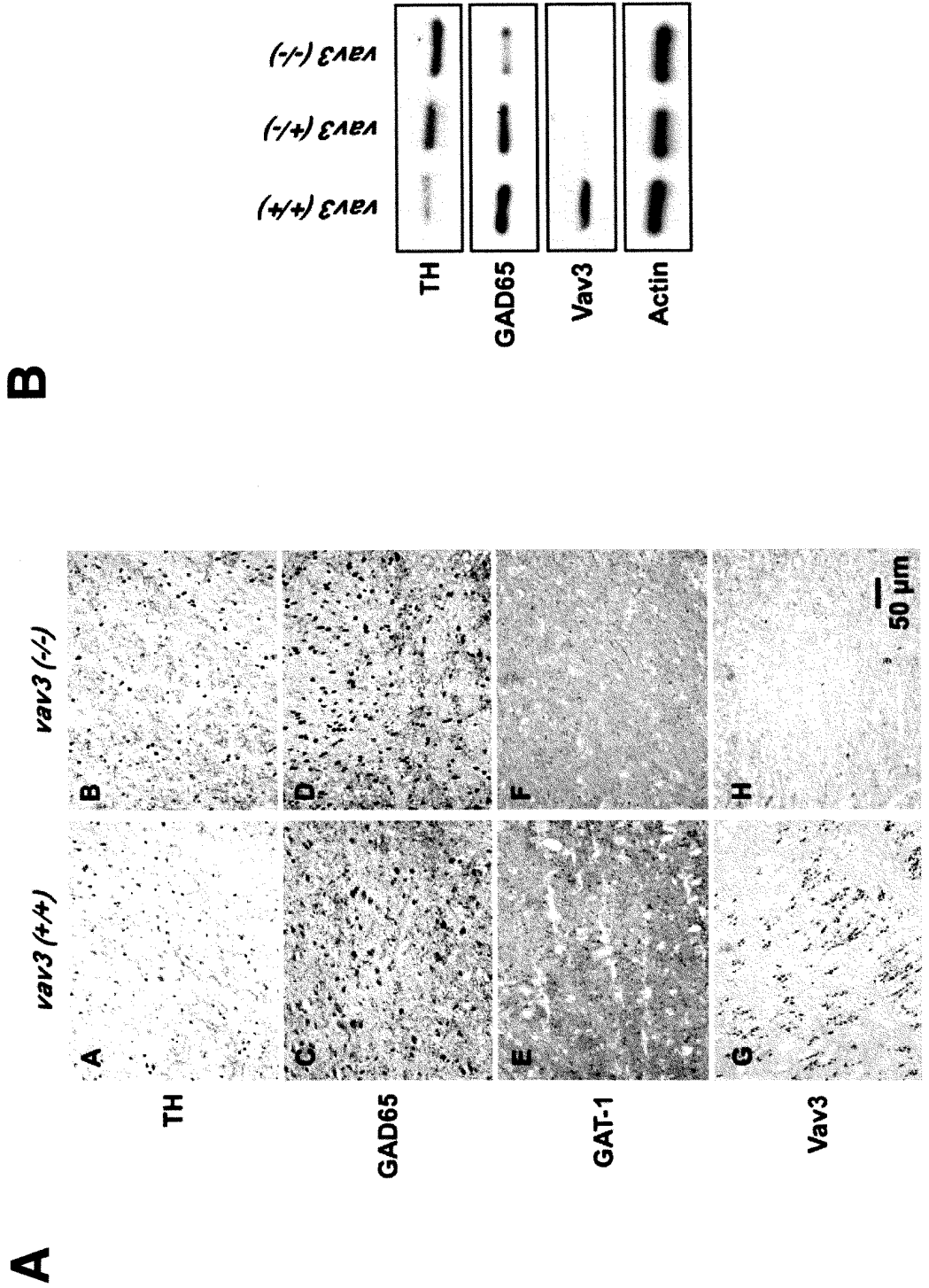
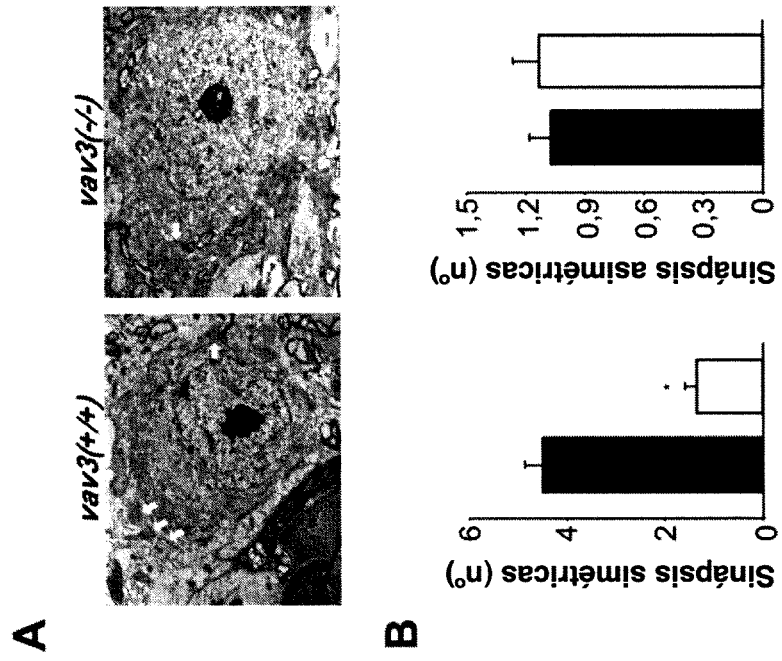


FIG. 14



ES 2 318 921 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

- 5 <120> ANIMAL MODELO NO HUMANO CARENTE DE LA EXPRESIÓN DEL GEN VAV3, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES
- 10 <130> VAV3
<160> 12
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
- 20 <213> Artificial sequence
- <220>
<223> Oligo 23F
- 25 <400> 1
- ggacatggag ccgtggaagc 20
- 30 <210> 2
<211> 20
<212> DNA
- 35 <213> Artificial sequence
- <220>
<223> Oligo 168F
- 40 <400> 2
- 45 tgagcagctg gcagagcagg 20
- <210> 3
- 50 <211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence
- 55 <220>
<223> Oligo M13F
- <400> 3
- 60 gtaaaacgac ggccagt 17
- 65 <210> 4
<211> 16
<212> DNA

ES 2 318 921 B1

<213> Artificial sequence

<220>

5 <223> Oligo M13R

<400> 4

10 aacagctatg accatg

16

<210> 5

15 <211> 2942

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20 <220>

<223> Región promotora, exon 1 e intrón 1 de vav3

<220>

25 <221> promoter

<222> (1)..(677)

<220>

30 <221> exon

<222> (704)..(907)

<220>

35 <221> Intron

<222> (908)..(2942)

40

45

50

55

60

65

ES 2 318 921 B1

```

cac tcc atc aat ctg aag gag atc aac ctg agg ccc cag atg tcc cag   907
His Ser Ile Asn Leu Lys Glu Ile Asn Leu Arg Pro Gln Met Ser Gln
5          55                      60                      65

gtatggaggc caccccgca ccccgctgcc cgtcagaggc tcccattaat catccggata   967

atctctttgt gtaaatgcaa acatctaggt gcgctccgct ttgccctgcc tctcagttct 1027
10

cagcttgggg gcttttcctc acttgccttg aatgactta gcttctaagc agaactaata 1087

aagccttgcg tcgggagatg gtgtatggaa tcctaaaggt ttctgggagg cggaagaaa 1147
15

taagttatcc tagggcgcg ttcaccttc tgcctcccc ccccgctgtg gtgtgtgtgt 1207

gtgtgtgtgt gtgtgataac aaagaggag tcggctctaa aataacaatg agaagggatg 1267
20

agatgaagcg gtggggtaa ttttgcttg acttattttt tgctttcatt tggctctcac 1327

gttctggaaa gaggaactgt gccatagatg aggactctag gaagtggagg gcgtttggta 1387
25

ccgttatctg ctgagaggaa ataaaccaag agggacacag agagccttcc tgaagttccc 1447

caccccgccc cctaagccc tggcctgta gcaaactgga aggttgtgtt tatagcttgt 1507

ctgaaaacgt aaggggagcc agcccagcct ccctcaccgg tggcaggaag tgagaagttt 1567
30

tgctggagac tctgcttttt ttcattgggt cttgcatca ggtagcttgg aggcaacttg 1627

gcttctgtgg ccttagcttg gagatacctc tttgagggtt ctgattaaaa tccagtcctg 1687
35

gaaggcacag aaagcagtgg gttcctcaga gacagctcaa aaagccacat gcagcccagt 1747

gctgcttatt tttgggccg gtcggaaagt ttctgttaa aggatgttca acacaactca 1807
40

gaacttctat tttctcttc acacgcacac gcacatgcac acgaaaagaa aaagaaatgt 1867

ttcaacttaa aaggggaagg aaagagacct tttagtaca tattttagca ctagccctgt 1927

atgattcaga gacttaccac ttaccagag ctgtgtcctt gcagaaaaaa gtgatcttat 1987
45

gcagtttaat aatctcataa ttaaagcagg aactcccaca ctctgccctg gttgtcagta 2047

tttcatcagg gtcgatcctc acttcaaatt ctgtgtcccc tgttgtaag cagtctcaa 2107
50

ggaaaaaaaa aagcagatat ataagtattg agtgccatat gtgtttaca taaggatcaa 2167

ttattttaga ctctcttaga aacctgaatg atgggtgatt gctaattctg tggacttgcc 2227
55

cacaattgtg gcaaccatag atagtctgt ggagggttc agtggttgtt tctgtactgt 2287

ctgagttaac tgttaggagt aaggttgtgc cacgcacagg agtcacttgt tagatctcca 2347

gttccatttg atcagtagtc tcagtagcag catgaagtct tgtgcttga tgccacgtgc 2407
60

tgtgcatatt tcctcgaagt ttagtttctg gaactttcag cagttactca tcaaagtgtt 2467

cttaataatc aaatttctct cttctttctt tttccttcc tcctttcct tttctaactg 2527
65

cctgcctgcc ttccttctt ccttcttcc ttccttctt ccttcttcc ttccttctt 2587

```

ES 2 318 921 B1

cctttttgga tagctgggca ttctttgaca ttcaagtctt tatttgactg ctgacagtgc 2647
atgggatctt gtcaagtgga ttctcctctt tcttctctta aaatgcatta tctataatgt 2707
5 aatcagtttg atgactgaag gtcattataa gcatcattga tgaaaaggag cagggcatga 2767
ttctctaaga attctatttc ctactgaggc caccacagtg aacatatcaa gatagttagt 2827
10 tgcccttaag gaattattac actgatatca ataaaccacc agattatagt gaggtaagta 2887
gggcagtgaa ctgactcttc attagatttt tcttttgagt ttttaagtca gtcca 2942

15 <210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence
20 <220>
<223> Oligo b GH2

25 <400> 6
gcatcgcatt gtctgagtag g 21

30 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> Oligo VAV3-KO-3

40 <400> 7
tgagcagctg gcagagcagg 20

45 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

50 <220>
<223> Oligo VAV3-KO-3'

55 <400> 8
ggacatggag ccgtggaagc 20

60 <210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

65 <220>
<223> Oligo ATI-F

ES 2 318 921 B1

<400> 9
aaaggccaag tcgcaactcaa g 21

5 <210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> Oligo ATI-R

15 <400> 10
athtagtccg atgctgccct g 21

<210> 11
20 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

25 <220>
<223> Oligo p36b4-F

30 <400> 11
gtgtttgaca acggcagcat t 21

<210> 12
35 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40 <220>
<223> Oligo p36b4-R

<400> 12
45 ttgatgatgg agtgtggcac c 21

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 921

② N° de solicitud: 200501208

③ Fecha de presentación de la solicitud: **18.05.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01K 67/027** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FUJIKAWA K. et al., "Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells" Journal Of Experimental Medicine (2003), 198(10), pág. 1595-1608.	1-2,4-5
Y	DATABASE EMBL 22 Noviembre sw 1999. TRENKLE et al., "Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors" Recuperado de EBI. N° Acceso: AF067816	1-2,4-10, 12-14, 16-30
Y	CAPECCHI et al., "Altering the genome by homologous recombination" Science (1989), vol. 244, pág. 1288-1292.	1-2,4-10, 12-14, 16-30
A	MOVILLA et al., "Biological and regulatory propoerties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins" Molecular and Cellular Biology (1999), vol. 19, pág. (7870-7885).	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.03.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,HCAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,EBI DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,6-30	SÍ
	Reivindicaciones	1-2,4-5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,11,15	SÍ
	Reivindicaciones	1-2,4-10,12-14,16-30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FUJIKAWA K. ET AL., "Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells" Journal Of Experimental Medicine (2003),198(10), pág.1595-1608.	2003
D02	DATABASE EMBL 22 Noviembre sw 1999. TRENKLE ET AL., "Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors" Recuperado de EBI. N° Acceso: AF067816	1999
D03	CAPECCHI ET AL., "Altering the genome by homologous recombination" Science (1989), vol. 244, pág.1288-1292	1989

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente solicitud se refiere a un mamífero no humano knockout útil como modelo experimental cuyo genoma porta el gen vav3 mutado y es deficiente en la proteína vav3 endógena. En una realización particular este mamífero se caracteriza porque es un ratón que contiene una delección dentro de la región 5' del gen vav3 (zona promotora y parte del exón 1 (SED ID NO 5) que conlleva la inactivación del gen vav3 endógeno y la ausencia de expresión de la proteína codificada por este. Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de dicho animal, así como una célula eucariota mutada. Este modelo animal o línea celular pueden emplearse en un procedimiento para determinar el efecto de un fármaco útil para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos derivados de dicha deficiencia de la proteína Vav3, por ejemplo problemas de coordinación motora, hipertensión esencial, hiperplasia cardíaca y arterial, taquicardia y esquizofrenia.

2.1 NOVEDAD

El documento D01 describe en las páginas 1596 y 1597 la obtención de ratones heterocigotos y homocigotos deficientes en Vav-3 mediante un procedimiento de recombinación homóloga en el que el exón 10, que codifica parte del dominio DH se sustituye con el gen de resistencia a neomicina. A la vista de la información técnica divulgada en este documento esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-2 y 3-4 carecen de novedad.

2.2 ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D02 describe la secuencia mRNA de la proteína VAV-3. Por su parte en el documento D03 se describe la tecnología knockout basada en la recombinación homóloga. De acuerdo con este documento, una vez que el gen responsable de una enfermedad es identificado y clonado, es posible obtener ratones mutantes deficientes en dicho gen que sirvan como modelos experimentales para las correspondientes enfermedades. En consecuencia, y a la luz de la información técnica divulgada en D02 y D03, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-2,4-10,12-14,16-30 carecen de actividad inventiva,