



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 303 454**

(21) Número de solicitud: **200602969**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **21.11.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

Fecha de la concesión: **21.05.2009**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **17.06.2009**

(55) Fecha de publicación del folleto de la patente:
17.06.2009

(73) Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Salamanca**

(72) Inventor/es: **García Bustelo, Xose Ramón y
Sauzeau, Vincent**

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Utilización de mamíferos no humanos carentes de la expresión y/o actividad de la proteína Vav2 en campos cardiovascular, renal y neurológicos.**

(57) Resumen:

Utilización de mamíferos no humanos carentes de la expresión y/o actividad de la proteína Vav2 en campos cardiovascular, renal y neurológicos.

La invención se relaciona con la utilización de mamíferos no humanos que han sido alterados genéticamente para eliminar el gen Vav2 y/o reducir la expresión de los niveles de su RNA mensajero o de la proteína que codifica, la molécula Vav2. Este modelo animal, o líneas celulares derivadas del mismo, pueden emplearse en procedimientos experimentales de diverso tipo para la identificación y caracterización de fármacos útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos de alta incidencia en humanos como la hipertensión esencial, hiperplasia cardíaca y arterial, taquicardia, fallos renales y procesos fibróticos. Este modelo es también de utilidad para la identificación de marcadores genéticos, bioquímicos, fisiológicos y de otro tipo que tengan valor pronóstico sobre enfermedades humanas poco caracterizadas como las mencionadas más arriba.

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de mamíferos no humanos carentes de la expresión y/o actividad de la proteína Vav2 en campos cardiovascular, renal y neurológicos.

5

Sector de la técnica

Esta invención se basa en el uso de mamíferos en los que se ha suprimido, total o parcialmente, la función de la proteína Vav2. Estos animales pueden ser usados para estudiar farmacológica o molecularmente enfermedades de carácter cardiovascular y/o nerviosas.

10

Estado de la técnica

Vav2 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 (Vav1, 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 fosfatases, 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].

25

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].

30

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 cardíaco congestivo, enfermedades renales y ataques cerebrales. Además, generalmente va asociada a otras disfunciones del organismo, como son la obesidad abdominal, la dislipide-mia, la intolerancia a glucosa, la hiperinsulinemia y la hiperuricemia. 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 cardíaco y la contracción del sistema vascular. Para revisiones sobre el tema, consultarse las siguientes referencias científicas: Lifton *et al.*, *Cell* 104: 545-556 [2001]; Staesens *et al.*, *The Lancet* 361: 1629-1641 [2003]; Takahashi y Smithies, *Trends in Genetics* 20: 136-145 [2004].

35

El circuito fisiológico que determina el control del ritmo cardíaco 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]; Staesens *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].

40

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. Alternativamente, pueden expresar formas mutantes de dichas proteínas, de tal manera que éstas actúen como formas dominantes negativas sobre la proteína endógena y, de esta manera, provocar su inactivación *in vivo*. Otra clase de estos mamíferos son los llamados mamíferos

5 "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). Otra clase de estos mamíferos son los llamados mamíferos "knockdown", en los que se ha suprimido la expresión de un gen endógeno a través de la expresión, por técnicas de transgénesis, de RNA pequeños de interferencia que se unen y degradan al mRNA codificado por dicho gen (lo que resulta en la eliminación de dicha proteína del organismo del mamífero). Como consecuencia de ello, existen ahora 10 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 AT_{1a} y AT_{1b}) y el del receptor de la 15 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 cambian de manera causativa en la hipertensión esencial. Para revisiones científicas sobre este tema, consultense 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].

20 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 25 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, un mutante dominante negativo de una proteína celular usada como diana molecular o, por el contrario, tengan la expresión de un gen concreto inactivado mediante mutaciones específicas en el mismo 30 (animales "knockout" o mutantes) o a través de la expresión de RNAs pequeños de interferencia (llamados, a partir de ahora, RNAi) que degraden sus tránscritos (animales "knockdown").

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 35 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.

40 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.

45 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. Un modelo con el gen Vav3 inactivamente ha sido recientemente descrito con alteraciones cardiovasculares y renales (Sauzeau, V., Sevilla, M.A., Rivas-Elena, J.V., de Alava, E., Montero, M.J., López-Novoa, J.M., and Bustelo, X.R. (2006). Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. *Nature Medicine* 12: 841-845), pero el modelo de la presente invención presenta nuevas características añadidas al anterior por lo que 50 reprenta un modelo animal útil para el desarrollo de fármacos.

Descripción de la invención

55 Descripción breve de la invención

El objeto de la invención es el empleo de un animal no humano o de la línea celular derivada del mismo, deficientes en la expresión y/o actividad de la proteína Vav2 endógena y en un procedimiento para la determinación del efecto 60 de un fármaco o combinación de fármacos útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de base cardiovascular, renal y/o nerviosa.

Descripción detallada de la invención

65 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, síndromes de estrés, entre otros.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que la anulación de la actividad funcional de la proteína Vav2 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 y taquicardia. Este animal es viable, fértil y no manifiesta 5 en condiciones de laboratorio ningún síntoma que los diferencie de ratones genéticamente similares pero carentes de dicha mutación por lo que, en condiciones de estabulación controlada, estos ratones mutantes son indistinguibles de sus hermanos de camada salvajes. Sin embargo, la caracterización fina de estos ratones indica que la eliminación de la proteína Vav2 endógena está asociada a desórdenes del sistema nervioso simpático y vascular y, como consecuencia, de una profunda desregulación del control del sistema cardiovascular. Esta disfunción conlleva la aparición de 10 una enfermedad cardiovascular clásica que combina taquicardia, hipertensión e hiperplasia cardíaca y arterial, fallos renales, fibrosis cardíaca y renal, etc. Aunque estas observaciones se han realizado con un ratón "knockout" que posee el gen *Vav2* inactivado por técnicas de recombinación homóloga, similares resultados podrían obtenerse mediante la generación de animales transgénicos que expresen una forma dominante negativa de *Vav2* (por ejemplo, su región C-terminal 15 conteniendo los dominios SH3-SH2-SH3 de su molécula), un RNAi que degrada el RNA mensajero de este gen (ratones "knockdown"), un microRNA que inactive el gen o mRNA de esta proteína, o con ratones salvajes en los que la actividad de la proteína Vav2 endógena pueda ser inhibida a través de drogas o fármacos que inactiven su actividad enzimática o su fosforilación y activación por proteínas tirosín cinasa. También es posible obtener modelos animales útiles utilizando ratones "knockout" que, en vez de ser generados como en el caso anterior por recombinación 20 homóloga, lo sean por la integración en dicho locus de entidades retrovirales o trasposones que provoquen un efecto genético similar (la inactivación de dicho gen).

Los mamíferos no humanos modificados genéticamente de la presente invención pueden ser utilizados como modelos animales para estudiar *in vivo* el papel desempeñado por la proteína Vav2 endógena así como en el diseño y evaluación de compuestos químicos que podrían ser potencialmente interesantes para el tratamiento de alteraciones 25 patológicas relacionadas con la expresión nula o ineficaz del producto de dicho gen, o en las que estuvieran involucrado el proto-oncogén *Vav2*. Y más concretamente, por las disfunciones en sistema nervioso y cardiovascular observadas, el animal de la presente invención deficiente en la proteína Vav2 endógena puede resultar útil tanto para el estudio de patologías asociadas a neuronas simpáticas y, sobre todo, a procesos cardiovasculares (hipertensión, fallos renales, taquicardia) como para la validación y/o el desarrollo de fármacos diseñados para regular o paliar los efectos de las 30 alteraciones y condiciones patológicas en las que está implicada la proteína Vav2 endógena. Como prueba de ello, la enfermedad cardiovascular de animales knockout carentes del gen *Vav2* puede ser prevenida tratándolos con fármacos anti-hipertensivos en uso en humanos en estos momentos, como son el captoril (ver Figura 8A-D), el losartán (ver Figura 8E) o el propanolol (ver Figura 9).

35 De forma más particular, el modelo animal Vav2 presenta unas alteraciones nuevas, distintas de las observadas en el modelo Vav3, y que proporcionan evidencias para nuevas aplicaciones del modelo de la presente invención. Así, los ratones *Vav2*^{-/-} desarrollan fibrosis tanto en el corazón como en los riñones (aunque de morfología normal), una alteración patológica que se observa por primera vez en animales mayores de cuatro meses de edad (Figura 1E-G). Al mismo tiempo, los ratones *Vav2*^{-/-} orinan menos y presentan tasas menores de excreción de sodio y liberación 40 de creatinina (Figura 2A, 2C y 2D), con niveles de filtración menores que los animales salvaje control en la corteza renal (Figura 2B). Además, se observaron niveles elevados de vasopresina y aldosterona (hormonas reguladoras de la actividad renal) en el plasma de los ratones *Vav2*^{-/-} (Figura 3) y que el tratamiento con propranolol bloqueaba el incremento de ambas hormonas en el plasma de estos ratones. Finalmente, y de forma sorprendente estos estudios demostraron un aumento considerable de los ventrículos cerebrales de los ratones *Vav2*^{-/-}, lo que indicaba un síndrome 45 hidrocefálico (Figura 4).

Asimismo, dichos mamíferos no humanos mutantes de la invención podrían ser utilizados como fuente de células para cultivos celulares.

50 Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un mamífero no humano modificado genéticamente (vía knockout, knockdown o por otras técnicas de transgénesis) como modelo experimental, en adelante animal modelo de la invención, viable, en la que los niveles de la proteína Vav2 han sido reducidos o anulados a través de diversas técnicas genéticas o farmacológicas. 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 55 roedores, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, pertenecientes al siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones, así como primates no humanos. 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 *Vav2* endógeno contienen un DNA exógeno que ha sido insertado en dicho gen de manera 60 que dicho mamífero no humano mutante no expresa la proteína Vav2 endógena. El término "knockdown" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la supresión parcial o total de la expresión de la proteína endógena Vav2 a través de la expresión, por técnicas de transgénesis, de un RNAi específico para el mRNA de *Vav2* de la misma especie que el mamífero no humano utilizado que, tras expresarse y anillarse específicamente a dicho mRNA, 65 provoca su degradación *in vivo*. El término "transgénico" tal como se utiliza aquí abarca tanto los "knockdown" ya mencionados como a aquellos animales mamíferos no humanos que expresen, mediante técnicas de transgénesis, una forma dominante negativa de la proteína Vav2.

ES 2 303 454 B1

Las expresiones "Vav2" o "proteína Vav2" se refieren a una enzima intracelular cuya actividad es dependiente de fosforilación en tirosinas y que promociona el intercambio de nucleótidos de guanosina en las GTPasas de la familia Rho/Rac (Schuebel *et al.* *EMBO J.* 17: 6608-6621 [1998]; Bustelo, *Mol. Cell. Biol.* 20: 1461-1477 [2000]). Como referencia de la proteína Vav2 puede utilizarse la proteína Vav2 codificada por el cDNA del *vav2* murino (Genebank, 5 número de acceso para el mRNA: NM_009500; Número de acceso para la proteína: NP_033526.1). También se refiere a otras versiones producidas por el gen *Vav2* por ajuste diferencial ("splicing").

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 Vav2 endógena.

10 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 Vav2 endógena generado, bien por recombinación homóloga tal y como se describe en las publicaciones Doody *et al.* *Nat. Immunol.* 2: 542-547 [2001]; Tedford *et al.* *Nat Immunol.* 2: 548-555 [2001] o, alternativamente, por procesos de integración de genomas virales u de otro tipo dentro de exones o intrones 15 del gen *Vav2*. En ambos casos, dichas modificaciones genéticas conllevan la inactivación del gen, el cual es incapaz de dar lugar a los mRNA y proteínas correspondientes.

20 En una realización particular, dichos mamíferos no humanos deficientes en la proteína Vav2 endógena, son mutantes heterocigotos para dicha mutación, mientras que en otra realización particular, dichos mamíferos no humanos son 25 mutantes homocigotos para dicha mutación. La descendencia de los mamíferos no humanos mutantes deficientes en la proteína Vav2 endógena constituye un aspecto adicional de la presente invención.

25 En otro aspecto, otro objeto de la invención lo constituye una célula eucariota mutada, en adelante célula Vav2 mutada de la presente invención, que presenta una disruptión del gen *Vav2* y que por tanto presenta una deficiencia, parcial o total, en la expresión de la proteína Vav2. Estas células pueden ser derivadas de dichos animales no humanos mutantes o, alternativamente, mediante la transfección de las mismas con RNAi o plásmidos de expresión que contengan 30 RNAs pequeños de interferencia que degraden el mRNA de la proteína Vav2 endógena. Estos RNAs pequeños de interferencia pueden ser introducidos en las células mediante técnicas de transfección o, alternativamente, mediante la utilización de vectores víricos como lentivirus, retrovirus, o adenovirus.

30 Otro objeto particular de la invención lo constituye una célula *Vav2* 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 del animal modelo de la invención en la fase preimplantatoria denominada blastocisto. Estas células normalmente expresan el producto del gen *Vav2* pero la disruptión de dicho gen impide la 35 expresión total o parcial de la proteína Vav2. De esta forma, dichas células pueden ser heterocigotas, es decir, que contienen un alelo mutante y un alelo tipo salvaje del gen *Vav2* endógeno o bien homocigotas, es decir, que contienen los dos alelos mutantes del gen *Vav2* endógeno. Todos estos tipos celulares pueden ser propagados y, en su caso y opcionalmente, inmortalizadas por un experto en base al conocimiento existente en el estado de la técnica de tal forma 40 que constituyan una línea celular con alteración de la expresión de la proteína Vav2 parcial o totalmente.

40 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una célula *Vav2* mutada de la invención caracterizada porque es una célula diferenciada.

45 La disruptión funcional del gen *Vav2* endógeno se puede producir de distintas formas. En primer lugar, se puede realizar mediante recombinación homóloga entre una construcción knockout *Vav2* y el correspondiente gen *Vav2* endógeno de dicha célula hospedadora. Estas construcciones pueden ser, entre muchas otras posibles, las publicadas en las siguientes contribuciones científicas: Doody *et al.* *Nat. Immunol.* 2: 542-547 [2001]; Tedford *et al.* *Nat Immunol.* 2: 548-555 [2001]. La disruptión puede realizarse mediante la integración de una secuencia retroviral dentro del gen *Vav2*, dando lugar a su inactivación al no poder generar los RNA mensajeros apropiados. La transformación celular 50 mediante recombinación homóloga del gen *Vav2* o por la integración retroviral antedicha provoca una disruptión del gen *Vav2* endógeno y, consecuentemente, la deficiencia en la expresión de la proteína Vav2 en los órganos del animal, un defecto que se traslada de forma constante a la progenie de dicha célula al estar basado en la modificación de las secuencias nucleotídicas del gen endógeno.

55 Por otro lado, pueden existir otras formas para inducir la disruptión 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 *Vav2* capaz de anular su actividad biológica, seleccionándose dicho elemento inhibidor entre:

- 60 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína Vav2,
b) una ribozima específica del mRNA de la proteína Vav2,
65 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína Vav2, y
d) un RNA pequeño de interferencia (RNAi) específico del mRNA de la proteína Vav2.

ES 2 303 454 B1

e) un microRNA que, al expresarse, provoque la inactivación del gen o mRNA que codifican la proteína Vav2, y,

f) una secuencia de nucleótidos específica del gen o del mRNA de la proteína Vav2 que codifique una versión mutante de la proteína Vav2 que actúe como una forma dominante negativa y, de esta forma, compita e inhiba la proteína Vav2 endógena presente en dichos animales o células.

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)-f) mencionadas previamente impiden la transcripción del gen Vav2 en mRNA, la traducción del mRNA de Vav2 en la proteína Vav2, o la actividad de la proteína Vav2 y, por tanto, anulan la función biológica de esta molécula *in vivo*. Estas construcciones pueden ser desarrolladas por un experto en los sectores de la ingeniería genética y Biología molecular 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*, 2^a Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Ferández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 75-97; Kikuchi, *et al.*, 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J. Biochem.* 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22 (3): 326-330).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la célula mutada de la presente invención aislada a partir de un mamífero modelo no humano de la invención deficiente en la proteína Vav2 endógena.

Una realización particular de la presente invención lo constituye una célula mutada de la invención seleccionada preferentemente de una línea celular perteniente, 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.

Está incluido dentro del alcance de esta invención otros animales no humanos en los que, además de la supresión de la expresión del gen Vav2, se ha suprimido la expresión de uno o más genes distintos. Dichos animales no humanos se pueden generar utilizando técnicas de dominio público para la construcción de animales knockout (bien por recombinación homóloga, bien por integración retroviral o de otro tipo), 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.

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 animal no humano mutante carente de la expresión de la proteína Vav2 endógena 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 las figuras 8 y 9).

Los mamíferos de la presente invención podrían usarse 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.

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. Dado que la proteína Vav2 parece ser importante para procesos citoesqueléticos que determinan, entre otras cosas, la adecuada forma celular, migración, y otros procesos celulares (formación de sinapsis, metástasis, cáncer) estos ratones y células no humanas podrían ser de interés para 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, de la vasculatura, cáncer, metástasis, defectos inmunitarios, etc.).

Por lo tanto, otro objeto de la invención lo constituye el empleo del animal no humano o de la línea celular de la invención, deficientes en la proteína Vav2 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 Vav2.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de los animales modelo no humano de la invención o de la línea celular carente de la expresión y/o actividad de la proteína Vav2 en un procedimiento para determinar el efecto de un fármaco que comprende las siguientes etapas:

a) administración del fármaco o fármacos en forma y dosis adecuada al animal 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 Vav2.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de un animal o una célula 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 y disfunciones renales.

5 Otro objeto particular de la invención lo constituye el empleo de un animal o una célula knockout no humana de la invención en el que la determinación del efecto de los fármacos ensayados se realizaría sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav2, 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 10 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, 15 glutamato), cardiovascular (marcadores intracelulares, transmembranarias y extracelulares producidas por las células vasculares del músculo liso) o citoesqueleto (ensamblaje/desensamblaje de actina, motilidad celular, quimiotactismos, etc.).

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

20 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el empleo 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.

25 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

30 La Figura 1 muestra el estado anatomo-patológico de las aortas, corazones y riñones de ratones *Vav2^{-/-}* de cuatro meses de edad. La Figura 1A muestra la histología de las aortas de ratones salvajes (panel superior) y knockout (panel inferior), donde se aprecia que éstas últimas poseen una hiperplasia de la capa media de la aorta (las regiones señaladas por los asteriscos blancos). La Figura 1B muestra una cuantificación de los resultados anteriores, refiriendo 35 valores correspondientes al tamaño de la media de la aorta (panel izquierdo) y del número relativo de células de músculo liso presentes en las mismas (panel derecho). Es evidente que, a los cuatro meses de edad, los ratones *Vav2^{-/-}* experimentan los siguientes cambios cuando se comparan con los ratones salvajes control: (i) hiperplasia de la media de la aorta (comparar los dos imágenes presentes en el panel A), la cual se debe tanto a mayores números de células de músculo liso (cuantificadas en la gráfica del panel B) como de fibras de colágeno y elastina (ver panel A); (ii) una 40 desorganización de la media de la aorta, que pierde su estructura estratificada típica tanto en su componente fibrilar como celular. Estudios conducidos en paralelo a éste demostraron que estos defectos estaban circunscritos a la circulación sanguínea sistémica, puesto que las arterias pulmonares no mostraban alteraciones de ningún tipo cuando se comparaban con los animales control. La Figura 1C muestra la histología de los corazones de ratones salvajes (panel superior) y knockout (panel inferior), donde se aprecia que éstos últimos poseen una marcada hipertrofia de sus ventrículos izquierdos (indicados mediante asteriscos blancos). La cuantificación del peso (en miligramos) de los ventrículos 45 izquierdo y derecho, de la ratio ventrículo derecho (VD)/ventrículo izquierdo (VI), y del tamaño de los cardiomiositos (expresado en μm^2) se muestra en la Figura 1D. Estos resultados indican que la hipertrofia del ventrículo izquierdo se debe fundamentalmente a un aumento en el tamaño medio de los cardiomiositos de dicha región. No se observaron cambios significativos en los ventrículos derechos. La Figura 1E muestra la fibrosis que desarrolla en el corazón de los 50 ratones *Vav2^{-/-}* de cuatro meses de edad tal y como se revela con tinciones con rojo Sirio, un colorante que reconoce específicamente las fibras de colágeno intersticiales. La Figura 1F corrobora la fibrosis de los ratones *Vav2^{-/-}* a través de un método bioquímico basado en la cuantificación de los niveles tisulares de hidroxiprolina, un aminoácido que 55 está presente en altas cantidades en las fibras de colágeno. La Figura 1G muestra la fibrosis que se desarrolla en los riñones de los ratones *Vav2^{-/-}* de cuatro meses de edad tal y como se revela con tinciones con rojo Sirio. La Figura 1H muestra la evolución de la fibrosis renal (estimada a través de los niveles de hidroxiprolina tisulares) a lo largo de la vida de los ratones *Vav2^{-/-}*. Estos resultados indican que los ratones *Vav2^{-/-}*, además de sufrir remodelación cardiovascular, desarrollan procesos fibróticos tanto en el corazón como en el riñón. Las barras de escala mostradas en los paneles A, C, E y G representan, respectivamente, 100 (m, 1 mm, 20 (m y 50 (m. Los asteriscos de los paneles B, D, F y H representan índices de probabilidad estadística menores del 0.01.

60 La Figura 2 demuestra que los ratones carentes del gen *Vav2* desarrollan también problemas renales. La Figura 2A muestra que los ratones *Vav2^{-/-}* producen menos orina (estimada en (1/día) que los animales control. La Figura 2B muestra, mediante técnicas de imagen en tiempo real usando resonancia magnética, que la filtración de los riñones es menor en los ratones *Vav2^{-/-}* que en los control. La Figura 2C enseña que los riñones de los ratones *Vav2^{-/-}*, cuando comparados con los de ratones salvajes control, excretan menos cationes sodio, aunque la excreción de cationes potasio y aniones cloruro no cambia significativamente. La Figura 2D muestra que la liberación de creatinina en orina está ligeramente disminuida en los riñones de los ratones *Vav2^{-/-}*. Los símbolos “#” y “**” indican en todos los paneles 65 índices de probabilidad estadística menores del 0.05 y 0.01, respectivamente.

La Figura 3 muestra que las disfunciones renales detectadas en los ratones *Vav2^{-/-}* (ver Figura 2) son debidas a incrementos que se producen en los niveles de vasopresina (panel 3A) y aldosterona (panel 3B) en el plasma de estos animales. Estas dos hormonas regulan, respectivamente, la reabsorción de agua y sodio en las nefronas del riñón. Los símbolos “#” y “*” indican en todos los paneles índices de probabilidad estadística menores del 0.05 y 0.01, respectivamente.

La Figura 4 muestra imágenes obtenidas en tiempo real usando resonancia magnética (RMI) de la cavidad craneal de ratones *Vav2^{-/-}* y *Vav2^{+/+}*. c, cerebro; e, ojo; n, nariz; v, ventrículo. La RMI revela zonas de tejidos con alto contenido en agua (áreas blancas) como son los ventrículos del cerebro (v), los ojos (e), las orejas, la médula de los dientes, el corazón, a vejiga, etc. En estas imágenes, el incremento en el tamaño de los ventrículos cerebrales se observa claramente tanto en secciones frontales (paneles superiores) como horizontales (paneles inferiores) de las RMI procedentes de ratones *Vav2^{-/-}*, indicado que estos animales sufren hidrocefalia.

La Figura 5 muestra una tabla en donde se resumen los valores medios y desviaciones estándar obtenidas del ritmo cardíaco (en latidos/pulsaciones por minuto), presión arterial sistólica, diastólica y media (todas ellas expresadas en milímetros de mercurio) de ratones *Vav2^{-/-}* y *Vav2^{+/+}*. Como se ve en la tabla, los ratones *Vav2^{-/-}* poseen una marcada taquicardia e hipertensión cuando se comparan con los ratones salvajes *Vav2^{+/+}*.

La Figura 6 muestra los niveles de actividad o expresión de moléculas implicadas en la regulación cardiovascular. La Figura 6A muestra la evolución de los niveles plasmáticos de angiotensina II (panel izquierdo, expresado en picogramos por mililitro de plasma) y bradiquinina (panel derecho, expresado en picomoles por mililitro de plasma) en ratones *Vav2^{+/+}* y *Vav2^{-/-}* en ratones de las edades indicadas (expresada en meses). La Figura 6B describe los niveles de expresión relativos del RNA mensajero para los receptores AT1 (AT1a y AT1b) de la angiotensina II en los tejidos indicados de los ratones *Vav2^{-/-}* en comparación con los presentes en los ratones salvajes, todos ellos de cuatro meses de edad. La Figura 6C (panel izquierdo) 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 6C (panel derecho) 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 (expresados en nanomoles por minuto). Estas determinaciones se realizaron utilizando técnicas de radioinmunoensayo (RIA, panel C), reacción en cadena de la polimerasa en modalidad cuantitativa (panel B) y ELISA (paneles A y B). La Figura 6D muestra la evolución durante la vida de los ratones salvaje y homocigoto knockout para *Vav2* de los niveles plasmáticos de catecolaminas (neurotransmisores específicamente liberados por las neuronas del sistema nervioso simpático). El panel izquierdo de la Figura 6D muestra los niveles de noradrenalina (expresados en nanomoles por litro de plasma). El panel medio de la Figura 6D muestra los niveles de adrenalina (expresados en nanomoles por litro de plasma). El panel derecho de la Figura 6D 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). En todos los casos, los símbolos “#” y “*” indican índices de probabilidad estadística menores del 0.05 y 0.01, respectivamente. Los resultados presentados en esta figura indican que, cuando se comparan con los ratones *Vav2^{+/+}*, los ratones *Vav2^{-/-}* poseen las siguientes alteraciones fisiológicas: (i) niveles elevados de angiotensina II desde un mes tras el nacimiento y hasta, al menos, 12 meses de vida (panel A), (ii) niveles disminuidos de bradiquinina a partir de un mes de edad (panel A), (iii) expresión elevada del mRNA de los receptores AT1 (panel B), (iv) aumento de los niveles de actividad de las enzimas renina y ECA (panel C), v) aumento de los niveles de noradrenalina y adrenalina pero no de dopamina (panel D). La Figura 6E muestra la hiperplasia de la médula de la glándula suprarrenal en los ratones *Vav2^{-/-}* a través del análisis de secciones histológicas de glándulas suprarrenales de ratones *Vav2^{+/+}* y *Vav2^{-/-}* de cuatro meses de edad teñidas con hematoxilina-eosina. Se aprecia un aumento significativo del tamaño de las glándulas con la edad en los ratones *Vav2^{-/-}*. La Figura 6F demuestra que el aumento en el tamaño de la glándula suprarrenal se debe exclusivamente a una hipertrofia de su región medular y no de la cortical, como se aprecia por el aumento de la razón médula/cortex en dichos animales (panel derecho). El panel derecho de la misma Figura muestra que la glándula suprarrenal en su conjunto experimenta un tamaño considerable de tamaño cuando se compara su peso con el del animal en su conjunto.

La Figura 7 muestra el estado de la glándula suprarrenal en los animales *Vav2^{+/+}* y *Vav2^{-/-}* de cuatro meses de edad. La Figura 7A muestra una tinción de hematoxilina y eosina donde se demuestra la hipertrofia existente en las células simpáticas de la médula suprarrenal. La Figura 7B muestra imágenes obtenidas por microscopía electrónica donde se aprecia que las células de la médula suprarrenal de los ratones *Vav2^{-/-}* carecen de los gránulos de secreción de catecolaminas (se indica uno con una fecha blanca), un resultado que es indicativo de la alta actividad secretora de estas células. La Figura 7C muestra una inmunocitoquímica con anticuerpos contra la enzima tirosín hidroxilasa (un marcador de actividad simpática), donde se aprecia un aumento considerable en la expresión de este enzima en las médulas (áreas señaladas con la letra “m”) suprarrenales de los ratones *Vav2^{-/-}*. Las barras de escala corresponden a 20 μ m (panel A), 4 mm (paneles B) y 140 μ m (panel C).

La Figura 8 muestra los efectos de diversos inhibidores de enzimas del sistema renina-angiotensina II en la enfermedad cardiovascular de los ratones deficientes en el gen *Vav2*. Estos inhibidores incluyen el captopril y el losartán. En primero es un inhibidor específico de la actividad del enzima ECA. El losartán es un antagonista de la angiotensina II que bloquea su interacción con los receptores de tipo AT1. La Figura 8A-C 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 evaluaron los niveles en plasma de angiotensina

II (expresado en picogramos por mililitro; gráfica izquierda del panel A), de bradikinina (expresada en picomoles por mililitro; gráfica en posición media del panel A) y de noradrenalina (expresada en nanogramos por mililitro; gráfica derecha de panel A), la histología del corazón (Figura 8B, imágenes de la línea superior) y aorta (Figura 8B, imágenes de la línea inferior) y la fibrosis del corazón (Figura 8C, imágenes de la línea superior) y riñón (Figura 8C, imágenes de la línea inferior). Los asteriscos blancos indican el ventrículo izquierdo del corazón (imágenes de la línea superior del panel) y la media de la aorta (imágenes de la línea inferior del panel). En todos los paneles se aprecia que el tratamiento con captopril inhibe la enfermedad cardiovascular típica de los ratones *Vav2*^{-/-}, tal como se ve en rescate de los niveles normales de angiotensina II, bradikinina y noradrenalina (A) así como en las histologías normales de sus aortas (B), corazones (B, C) y riñones (C). Es rescate de la fibrosis del corazón y riñón por el captopril se corroboró mediante técnicas bioquímicas que evaluaban el contenido de hidroxiprolina en dichos órganos (Figura 8D). La Figura 8E muestra el efecto del losartán sobre la presión arterial media (PAM) de los ratones *Vav2*^{+/+} (barras negras) y *Vav2*^{-/-} (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 en este caso una edad de cuatro meses. Los efectos del losartán y captopril sobre la enfermedad cardiovascular y renal de los ratones *Vav2*^{-/-} confirma que la desregulación de la ruta de la angiotensina II está detrás de dicha patología. En los paneles A, D y E, los asteriscos indican un índice de probabilidad estadística menor del 0.01.

La Figura 9 describe el efecto del propranolol sobre la enfermedad cardiovascular presente en los ratones *Vav2*^{-/-}. 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 8 (ver más arriba). La Figura 9A muestra el efecto del propranolol sobre la presión arterial media (PAM) (expresada en milímetros de mercurio) de los ratones *Vav2*^{+/+} y *Vav2*^{-/-}. La Figura 9B muestra el efecto del propranolol sobre el ritmo cardíaco (expresado en pulsaciones por minuto) de los ratones *Vav2*^{+/+} y *Vav2*^{-/-}. La Figura 9C muestra el efecto del propranolol sobre los niveles de angiotensina II (expresados en picogramos por mililitro de plasma) de los ratones *Vav2*^{+/+} y *Vav2*^{-/-}. En todos estos casos, los asteriscos indican índices de probabilidad estadística menores del 0.01. La Figura 9D 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 *Vav2*^{-/-}. La Figura 9E muestra, a través de tinciones de cortes de tejidos con el colorante rojo Sirio, que el tratamiento con propranolol bloquea la aparición de la fibrosis del corazón (paneles superiores) y riñón (paneles inferiores) de los ratones *Vav2*^{-/-}. La Figura 9F enseña, a través de la determinación de los niveles de hidroxiprolina presentes en los órganos indicados, que el tratamiento con propranolol bloquea la aparición de la fibrosis del corazón y riñón de los ratones *Vav2*^{-/-} que, ahora, son indistinguibles de los controles. Los asteriscos indican índices de probabilidad estadística menores del 0.01.

35 Ejemplos de realización

Las aplicaciones de la presente invención en relación con su utilidad para el estudio biológico o farmacológico de problemas cardiovasculares, renales y nerviosos se entenderán mejor con referencia al siguiente ejemplo. Éste ha sido realizado utilizando ratones mutantes carentes de la expresión de la proteína Vav2 como consecuencia de la inactivación del gen Vav2 por técnicas de recombinación homóloga. Similares resultados serían obtenidos en caso de que este modelo animal fuese sustituido por los demás animales no humanos mutantes incluidos en esta patente. En todo caso, el ejemplo propuesto no se debe considerar de ninguna forma limitante del alcance de la invención.

45 Ejemplo 1

Preparación de un ratón knockout de Vav2

Cepas de ratón knockout mutantes deficientes en la proteína Vav2 endógena pueden ser generados a través de varias vías. Por ejemplo, puede seguirse los procedimientos previamente descritos tanto por Doody *et al. Nat. Immunol.* 2: 542-547 [2001] como por Tedford *et al. Nat Immunol.* 2: 548-555 [2001], los cuales inactivaron el gen endógeno a través de la integración en el mismo de secuencias procedentes de diferentes zonas del mismo gen, siempre modificadas por tecnología de ADN recombinante para que incluyesen secuencias nucleotídicas foráneas. Estas secuencias exógenas, al incorporarse al gen endógeno por recombinación homóloga, originan la disruptión transcripcional del gen endógeno y, como consecuencia, la falta de expresión de su mRNA y proteína. Estas no son las únicas vías, puesto que la inactivación del gen endógeno puede realizarse empleando cualquier otra secuencia nucleotídica obtenida de otras zonas del mismo locus. En nuestro caso, se utilizaron los procedimientos descritos por Doody *et al. Nat. Immunol.* 2: 542-547 [2001] para conseguir la inactivación del gen Vav2 endógeno. Estos procedimientos pueden ser realizados 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*, 2^a Ed. Humana Press, Cardiff University).

Ejemplo 2

Análisis de los efectos de la eliminación de la proteína Vav2

5 2A. *Histología de arterias, corazón, riñones y cápsulas suprarrenales*

Estos tejidos fueron aislados, seccionados y fijados en paraformaldehído al 4% en una 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 $Vav2^{-/-}$ experimentan los siguientes cambios cuando se comparan con los ratones salvajes control: (i) hiperplasia de la media de la aorta, la cual se debe tanto a un mayor número de células de músculo liso como de fibras de colágeno y elastina (Figura 1A-B); (ii) una desorganización de la media de la aorta, que pierde su estructura estratificada típica (Figura 1A); (iii) una hiperplasia del ventrículo izquierdo del corazón (Figura 1C-E); (iv) ningún cambio significativo en la morfología de los riñones y, (v) una marcada hipertrofia de la médula suprarrenal (Figuras 6E,F y 7A).

20 2B. *Determinación de la fibrosis cardíaca y renal*

Para la visualización *in situ* de fibrosis, secciones de corazón y riñones embebidas en parafina fueron tratadas con rojo Sirio (Fluka, Buchs, Suiza) para teñir el colágeno intersticial. Para la cuantificación del colágeno total presente en los órganos en estudio, se determinó el contenido de hidroxiprolina mediante espectrometría (Flores *et al.* *Exp Nephrol.* 6: 39-49 [1998]). Como se muestra en la Figura 1E-G, es evidente que los ratones $Vav2^{-/-}$ desarrollan fibrosis tanto en el corazón como en los riñones, una alteración patológica que se observa por primera vez en animales mayores de cuatro meses de edad.

2C. *Determinación de actividades renales*

La orina de animales fue colectada de manera individualizada en jaulas metabólicas durante 24 hr. Esto se realizó recogiendo la orina en tubos graduados que contenían 100 μ l de 0.1% ácida sódica (para evitar contaminaciones por microorganismos) y 1 ml de aceite mineral (para evitar la evaporación de las muestras). Muestras de sangre (150 μ l) fueron recogidas a través de la vena caudal de los animales en estudio para medir los niveles plasmáticos de creatinina. La concentración de este metabolito en orina y plasma fue medida usando una modificación del método de la reacción de Jaffé (Valdivieso *et al.* *Am. J. Physiol. Regul. Inegr. Comp. Physiol.* 280: R771-R779 [2001]). La concentración de electrolitos en sangre fue determinada usando un autoanalizador Hitachi. Estos experimentos demostraron que los ratones $Vav2^{-/-}$ orinaban menos y presentaban tasas menores de excreción de sodio y liberación de creatinina (Figura 2A, 2C y 2D). La actividad renal también se determinó a través de la visualización en tiempo real de la filtración de fluidos por los riñones de los animales en estudio mediante técnicas de imagen por resonancia magnética (MRI). Para ello, los animales fueron anestesiados por inhalación de 4% isofluorano y mantenidos inconscientes durante todo el tiempo de análisis por imagen mediante la administración constante de 2% isofluorano. Los animales anestesiados fueron puestos en un registrador termostatizado que mantuvo su temperatura a \approx 37°C. La MRI se realizó usando un aparato MBruker Pharmascan (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania). Para obtener un contraste dinámico de las tasas de filtración renal en tiempo real, las imágenes de MRI se recogieron tras la inyección de GdDTPA (0.2 mmol/kg peso corporal, B Magnevist, Schering) en la vena caudal. Durante los experimentos, las tasas respiratorias y de temperatura corporal fueron monitorizadas constantemente utilizando un monitor fisiológico Biotrig (Bruker). Para cuantificar las tasas de filtración, se definieron áreas idénticas en cada una de las imágenes obtenidas tanto en el córtex como en la médula renal, las cuales se mantuvieron constantes a lo largo del análisis de todas las series de imágenes recogidas. La evolución de la intensidad del GdDTPA en dichas áreas fue medida utilizando imágenes recogidas cada 3 min usando el programa informático Image J (National Institutes of Health, EE.UU.). Estos experimentos por MRI confirmaron que los ratones $Vav2^{-/-}$ tenían niveles de filtración menores que los animales salvaje control en la corteza renal (Figura 2B).

55 2D. *Determinación de hormonas reguladores de la actividad renal*

Se utilizaron técnicas de ELISA para la determinación de los niveles plasmáticos de vasopresina (Arg-Vasopressin ELISA kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI, EE.UU.) y aldosterona (Aldosterone ELISA, IBL, Hamburgo, Alemania) tal como indicaban los protocolos del suministrador comercial. Estos estudios demostraron niveles elevados de estas dos hormonas en el plasma de los ratones $Vav2^{-/-}$ (Figura 3). También permitieron ver que el tratamiento con propranolol bloqueaba el incremento de ambas hormonas en el plasma de estos ratones (Figura 10).

2E. *Visualización de la hidrocefalia*

65 En este caso, la MRI se realizó en el cuerpo entero del animal tal como se indicó en una sección anterior, salvo que se omitió la inyección del trazador GdDTPA. Estos estudios demostraron un aumento considerable de los ventrículos cerebrales de los ratones $Vav2^{-/-}$, lo que indicaba un síndrome hidrocefálico (Figura 4).

2F. *Presión arterial y frecuencia cardíaca*

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 nº L358/6, pág. 8509-8512, 18 de diciembre de 1986; BOE nº 67, pág. 8509-8512, 18 de marzo de 1988; "Guide for the care and use of laboratory animals", NIH publication nº 8523). Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg peso corporal) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). 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 cardíaco, 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 cardíaco. 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 cardíaco fueron registrados tras un periodo de adaptación de 20 minutos en todos los experimentos. Para registrar la presión arterial y frecuencia cardíaca en estado consciente, se utilizó un sistema automatizado multi-canal utilizando un manguito alrededor de la cola de los animales y un sensor fotoeléctrico (Niprem 546, Cibertec SA, Madrid, España).

Como se ve en la Tabla de la Figura 5, los ratones *Vav2*^{-/-} -pero no los *Vav2*^{+/+}- poseen una marcada taquicardia e hipertensión tanto anestesiados como sin anestesiar.

2G. *Determinación de los niveles plasmáticos de angiotensina II y bradikinina*

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, 100 µl 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 acetilcolinesterasa para inducir una reacción colorimétrica. La intensidad del color se determinó seguidamente por espectrometría (entre 405 y 414 nm).

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 µl de plasma.

Estos protocolos permitieron descubrir, entre otras cosas, que los niveles de angiotensina II y bradiquinina estaban elevados y reducidos en los ratones *Vav2*^{-/-}, respectivamente (Figura 6A). También permitieron ver que el tratamiento con captopril bloqueaba el incremento de angiotensina II (Figura 8A) y la disminución de la bradiquinina (Figura 8A) en estos ratones, un efecto que también se observaba con el tratamiento de los mismos ratones con el inhibidor propranolol (Figura 9C).

2H. *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 NO1)

AT1-R: 5' ATTTAGTCCGATGCTGCCCTG-3' (SEQ ID NO2)

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, Hercules, CA, EE.UU.). 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 p36^{b4}. En este caso, los cebadores usados en la PCR fueron el p36b4-F (5'-GTGTTTGACAACGGCAGCATT-3') (SEQ ID NO3) y el p36b4-R: 5'-TTGATGATGGAGTGT GGCACC-3' (SEQ ID NO4). Estas técnicas permitieron demostrar que el mRNA para los receptores AT₁ estaban incrementados en la aorta y el corazón de los ratones *Vav2*^{-/-} (Figura 6B).

2I. *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).

ES 2 303 454 B1

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 125 I 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 $Vav2^{-/-}$ (Figura 6C).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) se determinó mediante el uso del tripeptido Hippuril-His-Leu (Chevillard *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 148: 79-91 [1998], Chevillard *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14:297-301 [1999]). La proteasa ECA puede cortar dicho tripeptido, tras lo cual el producto de la reacción (Hippuril-His) puede ser cuantificado mediante métodos espectrofluorimétricos utilizando o-oftalaldehído. 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 Hippuril-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-oftalaldehído 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 $Vav2^{-/-}$ (Figura 6C).

2J. 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. Alemania). El uso de estas técnicas permitió observar que los niveles adrenalina y noradrenalina, pero no los de dopamina, estaban elevados en los ratones $Vav2^{-/-}$ desde el nacimiento (ver Figura 6D). También sirvieron para demostrar que el captopril inhibe el incremento de noradrenalina en el plasma de estos animales (Figura 8A).

2K. Microscopía electrónica de la glándula suprarrenal

Las glándulas 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 semifinas 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.). El uso de estas técnicas permitió demostrar la alta actividad de las células simpáticas presentes en la médula suprarrenal (Figura 7B).

2L. Detección de niveles de tirosin hidroxilasa (TH) la glándula suprarrenal

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 la glándula suprarrenal obtenidas según lo indicado en la Sección 1A fueron analizadas por técnicas inmunocitoquímicas estándar utilizando anticuerpos de conejo contra la tirosin 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. Estos estudios demostraron los altos niveles de TH en la médula suprarrenal de los ratones $Vav2^{-/-}$ (Figura 7C).

2M. Cuantificación de los efectos del captopril y losartán

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. Tras un periodo de 5 semanas, la presión arterial y ritmo cardíaco fueron determinados como se indica en la Sección 1F. Alternativamente, los ratones fueron sacrificados, tras lo cual su plasma fue utilizado para determinar la concentración de angiotensina II y bradiquinina (ver Sección 1G) y estudios histológicos y bioquímicos con secciones de corazón, aorta y riñones (ver Secciones 1A y 1B). 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 (Wilmington, 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 1F.

ES 2 303 454 B1

En la Figura 8 se aprecia que el tratamiento con captopril inhibe la enfermedad cardiovascular típica de los ratones *Vav2*^{-/-}, tal como se ve en los niveles bajos de angiotensina II y noradrenalina (A), los niveles altos de bradikinina (A) así como en las histologías normales de sus aortas (B), corazones (B) y riñones (C). El captopril también bloquea el desarrollo de la fibrosis de los corazones y riñones de los ratones *Vav2*^{-/-}. La Figura 8 muestra también que el tratamiento de los ratones *Vav2*^{-/-} con losatán produce una rápida disminución de su presión arterial media (expresada en milímetros de mercurio) (Figura 8E). En resumen, los efectos de estos dos inhibidores sobre la enfermedad cardiovascular de los ratones *Vav2*^{-/-} confirma que la desregulación de la ruta de la angiotensina II está detrás de dicha patología.

10 2N. *Cuantificación de los efectos del propranolol*

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. Ratones de tres meses de edad fueron mantenidos en el animalario con agua de beber que contenía o carecía del inhibidor propranolol (Sigma-Aldrich, concentración 0,5 μ g/ml). Tras un periodo de 5 semanas, la presión arterial y ritmo cardíaco fueron determinados como se indica en la Sección 1F. Alternativamente, los ratones fueron sacrificados, tras lo cual su plasma fue utilizado para determinar la concentración de angiotensina II (ver Sección 1G) y estudios histológicos y bioquímicos con secciones de corazón, aorta y riñones (ver Secciones 1A y 1B). Como se ve en la Figura 9, este tratamiento bloquea el desarrollo de todos los parámetros de la enfermedad cardiovascular y renal de los ratones *Vav2*^{-/-}, incluyendo la hipertensión (A), la taquicardia (B), los niveles altos de angiotensina II (C), la hipertrofia cardíaca y arterial (D) y la fibrosis cardíaca y renal (E, F).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Mamífero no humano knockout útil como modelo experimental **caracterizado** porque carece de la actividad de la proteína Vav2 endógena.
5
2. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque pertenece al siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones; y primates no humanos.
- 10 3. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un primate mutante no humano deficiente en la proteína Vav2 endógena.
4. Mamífero no humano según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un ratón mutante deficiente en la proteína Vav2 endógena.
15
5. Procedimiento de obtención de un mamífero no humano según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque se realiza por recombinación homóloga del gen Vav2 que comprende las siguientes etapas:
20
- a) elaboración de una construcción knockout de recombinación homóloga Vav2 con selección positiva que comprende unas regiones de homología con sendas secuencias de nucleótidos presentes en dicho gen Vav2 endógeno,
 - b) transformación de una célula con la construcción knockout de a),
 - c) selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva, y
 - 25 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.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la construcción knockout de recombinación homóloga Vav2 de a) es una secuencia de ácido nucleico que comprende:
35
- (i) una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen Vav2,
 - (ii) una secuencia marcadora empleada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula transfundida, 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.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen Vav2 de (i) comprende:
45
- a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen Vav2,
 - b) una secuencia promotora total o parcial del gen Vav2,
 - c) cualquiera de sus combinaciones, o
 - 50 d) una secuencia de cDNA de Vav2.
- 55 8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen Vav2 de la construcción knockout de (i) es una cualquiera de las formas homólogas del gen Vav2 existentes en un mamífero no humano.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizada** porque la forma homóloga del gen Vav2 pertenece a un animal del siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones y primates no humanos.
60
10. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la célula transformada de b) es una célula madre embrionaria (ES).
- 65 11. Construcción knockout de recombinación homóloga Vav2 **caracterizada** porque es una secuencia de ácido nucleico diseñada para disminuir o suprimir la expresión de la proteína Vav2 codificada por secuencias de DNA endógeno en una célula y comprende:
70
- (i) una secuencia de ácido nucleico de una parte del gen Vav2,

ES 2 303 454 B1

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

5 (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.

12. Construcción knockout de recombinación homóloga *Vav2* según la reivindicación 11 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *Vav2* (i) comprende:

- 10 a) una secuencia total o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen *Vav2*,
b) una secuencia promotora total o parcial del gen *Vav2*,
c) cualquiera de sus combinaciones, o
15 d) una secuencia de cDNA de *Vav2*.

13. Construcción knockout de recombinación homóloga *Vav2* según la reivindicación 12 **caracterizada** porque la secuencia de ácido nucleico de una parte del gen *Vav2* de la construcción knockout de (i) es una cualquiera de las 20 formas homólogas del gen *Vav2* existentes en un mamífero no humano.

14. Construcción knockout de recombinación homóloga *Vav2* según la reivindicación 13 **caracterizada** porque la forma homóloga del gen *Vav2* pertenece a un animal del siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y primates no humanos.

25 15. Célula eucariota mutada **caracterizada** porque presenta una disrupción del gen *Vav2* endógeno y una deficiencia, parcial o total, en la expresión de la proteína *Vav2*.

16. Célula eucariota según la reivindicación 15 **caracterizada** porque es una célula pluripotente indiferenciada 30 establecida a partir de la masa interna celular de un embrión knockout en la fase preimplantatoria denominada blastocisto.

17. Célula eucariota según la reivindicación 15 **caracterizada** porque es una célula diferenciada.

35 18. Célula eucariota según la reivindicación 17 **caracterizada** porque la célula diferenciada es aislada a partir de un mamífero knockout no humano según las reivindicaciones 1 a la 4.

19. Célula eucariota según la reivindicación 18 **caracterizada** porque la célula diferenciada proviene de una línea 40 celular.

20. Célula eucariota según las reivindicaciones 17 a la 19 **caracterizada** porque es una célula diferenciada perteneciente a una estirpe del siguiente grupo: células del sistema nervioso, del sistema cardiovascular o del sistema renal.

45 21. Célula eucariota según las reivindicaciones 17 a la 20 **caracterizadas** porque son heterocigotas u homocigotas.

22. Procedimiento de obtención de la célula eucariota según las reivindicaciones 17 a la 20 **caracterizado** porque es un procedimiento de transgénesis de anulación de la actividad funcional del gen *Vav2* que comprende la transformación de dicha célula eucariota mediante la introducción de una construcción génica que comprende un polinucleótido cuya 50 secuencia de nucleótidos codifica un elemento inhibidor de la expresión del gen *Vav2* 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 *Vav2*,
55 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína *Vav2*,
c) un aptámero específico del mRNA de la proteína *Vav2*, y
d) un RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico del mRNA de la proteína *Vav2*.

60 23. Empleo del mamífero no humano según la reivindicación 1 a la 4 o de la célula según la reivindicación 15 a la 21 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 *Vav2*.

65 24. Empleo según la reivindicación 23 **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

ES 2 303 454 B1

b) determinación de su efecto sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav2.

25. Empleo según la reivindicación 23 **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 5 cardíaca o arterial, u otros procesos como por ejemplo problemas neurodegenerativos motores, de erección de órganos sexuales, fibrosis renal y alteraciones de la filtración renal e hidrocefalia.

26. Empleo según la reivindicación 24 **caracterizado** porque la determinación del efecto de los fármacos ensayados b) se realiza sobre un parámetro indicativo de dicha deficiencia de Vav2 perteneciente al siguiente grupo: niveles 10 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 15 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), o de moléculas relacionadas con el citoesqueleto celular (polimerización/despolimerización de filamentos de actina, respuestas de señalización a factores mitogénicos o gases como el óxido nítrico, etc.).

27. Empleo según la reivindicación 23 **caracterizado** porque el animal es un roedor o un primate no humano.

20 28. Empleo según la reivindicación 23 **caracterizado** porque la línea celular es una línea derivada del sistema nervioso y/o cardiovascular.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

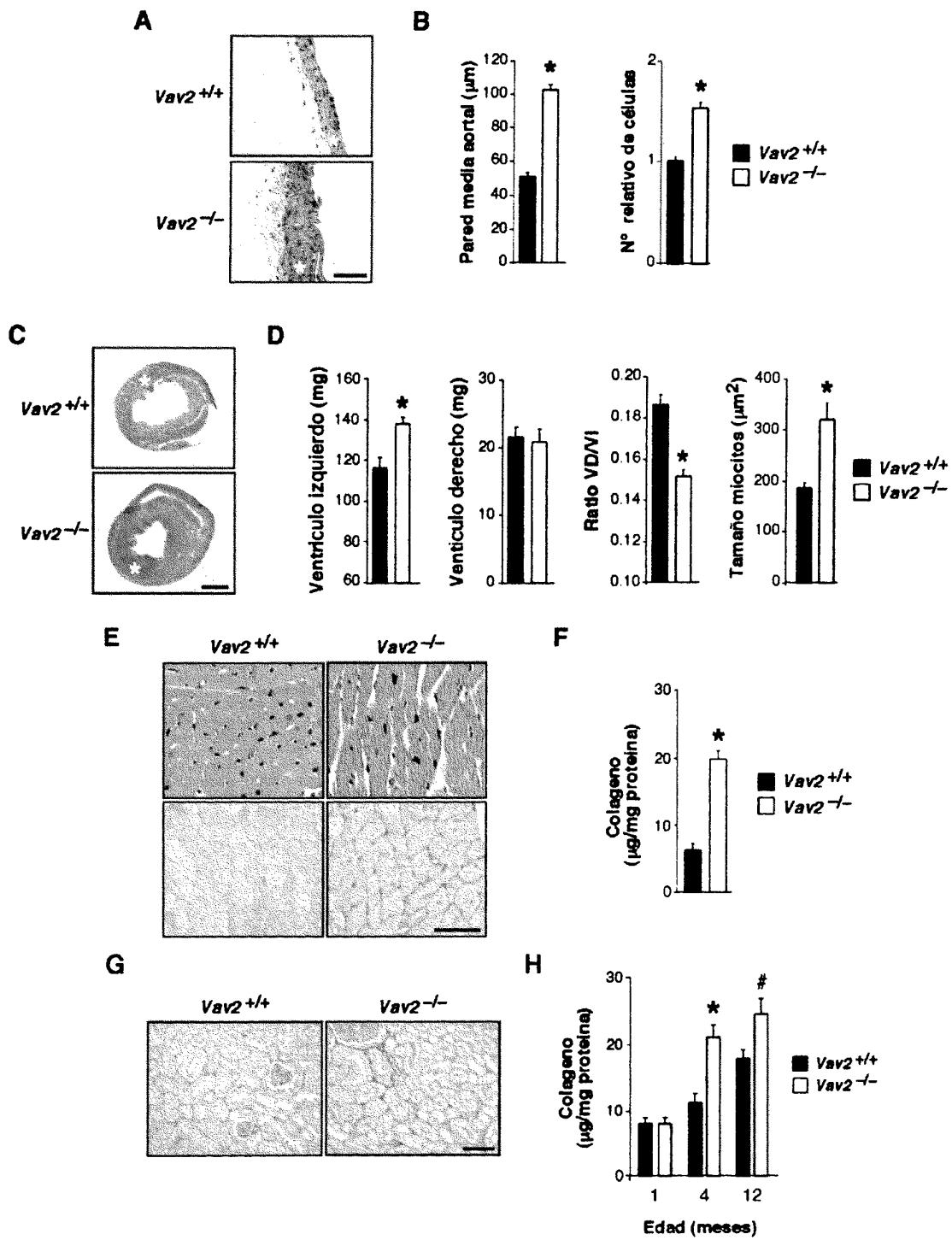


FIG. 2

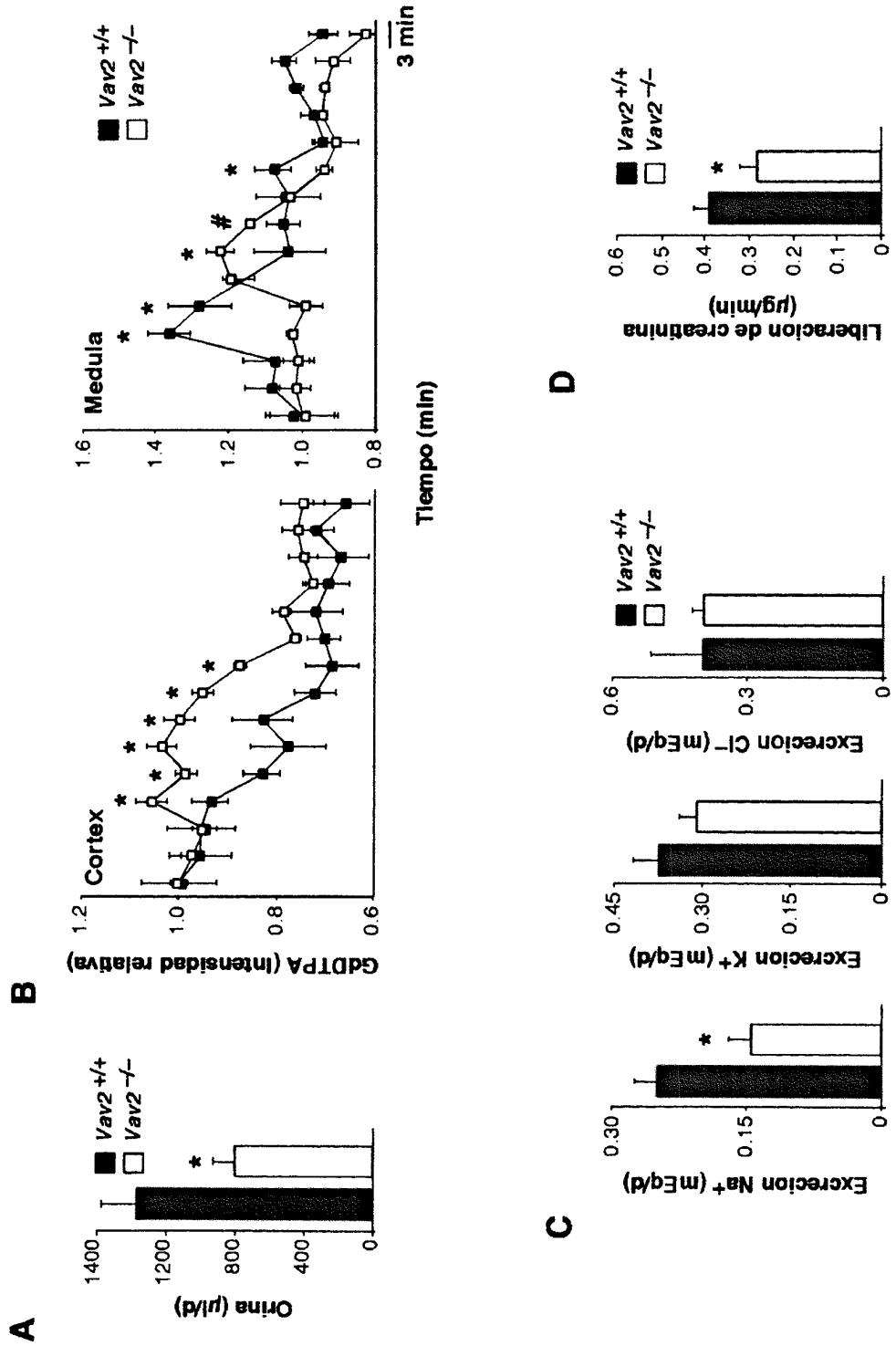
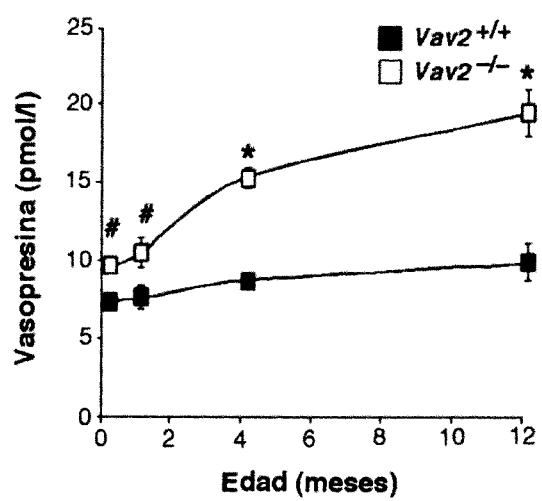


FIG. 3

A



B

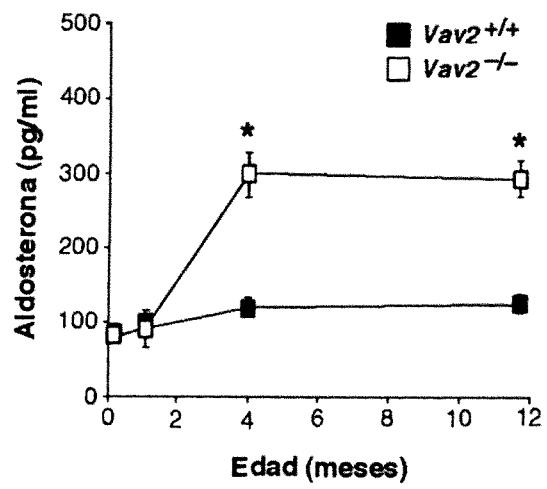


FIG. 4

Vav2^{+/+}

Frontal

May 2 - 1

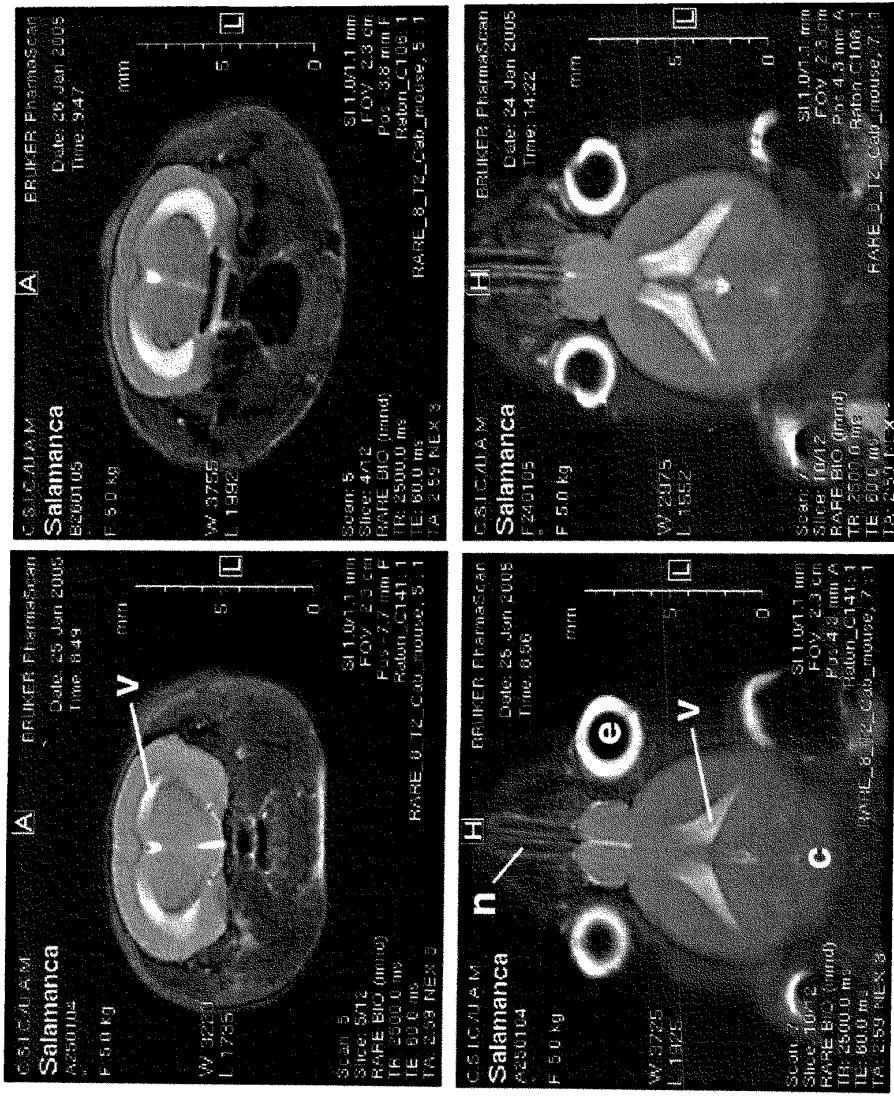


FIG. 5**Tabla 1.** Parámetros cardiovaseulares de los ratones *Vav2*^{+/+*}

	<i>Vav2</i> ^{+/+}	<i>Vav2</i> ^{-/-}
Presión arterial sistólica (mmHg)		
<i>En ratones anestesiados</i>	81.8 ± 1.7	108.2 ± 3.1*
<i>En estado consciente</i>	116.0 ± 6.0	138.0 ± 4.1*
Presión arterial diastólica (mmHg)		
	54.0 ± 1.9	65.5 ± 2.1*
Presión arterial media (mmHg)		
	63.2 ± 1.7	79.7 ± 2.2*
Actividad cardiaca (pulsaciones/min)		
<i>En ratones anestesiados</i>	328 ± 17	450 ± 27*
<i>En estado consciente</i>	520 ± 36	701 ± 87*

FIG. 6

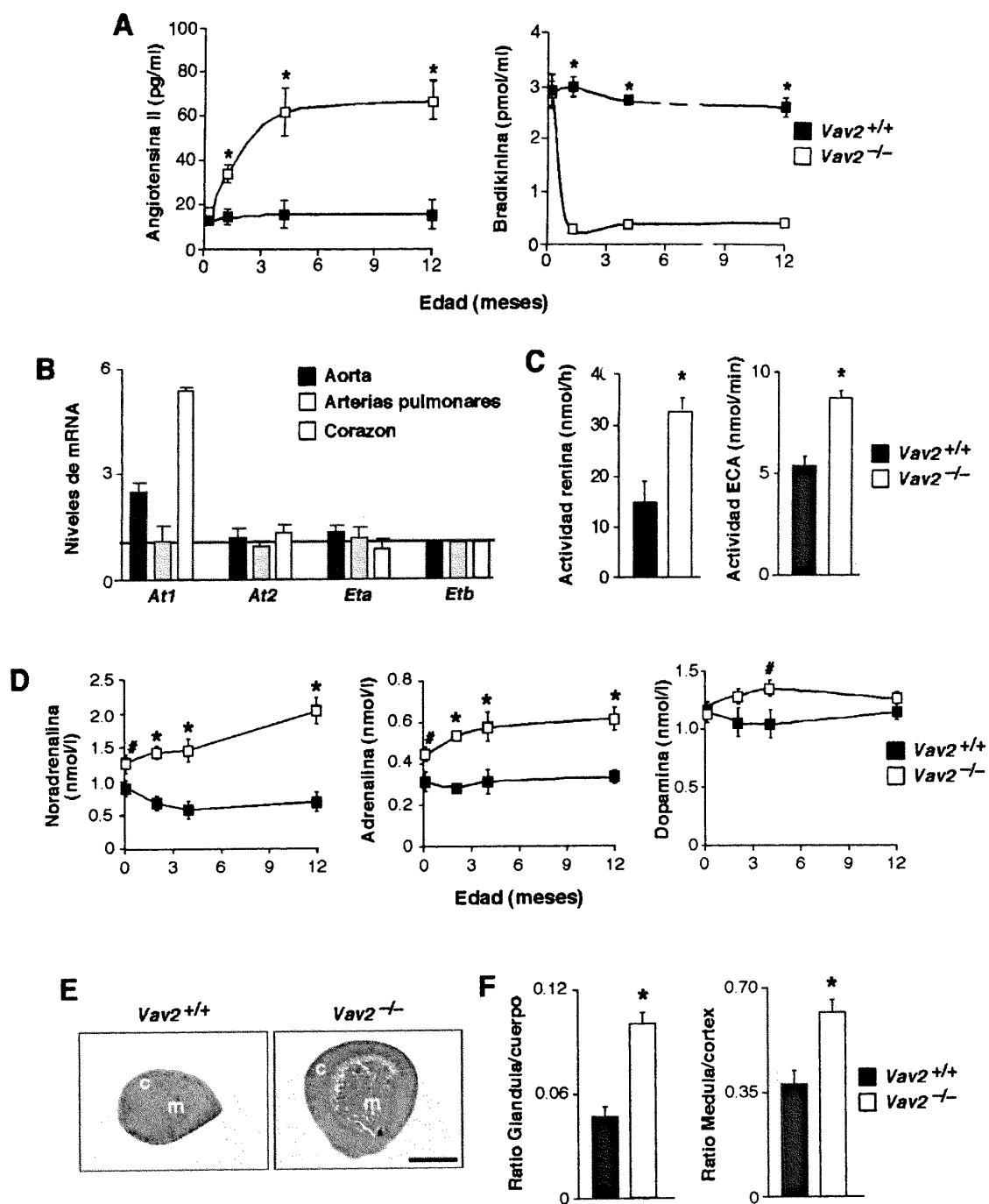
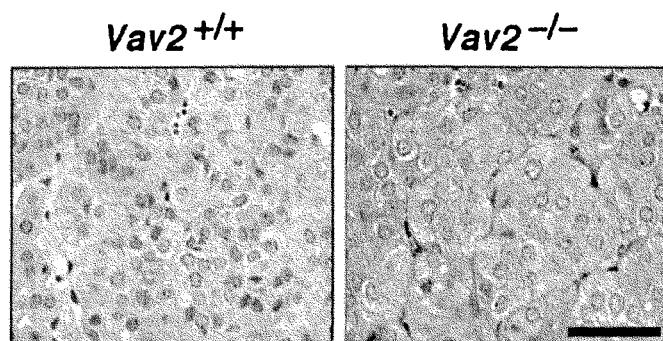
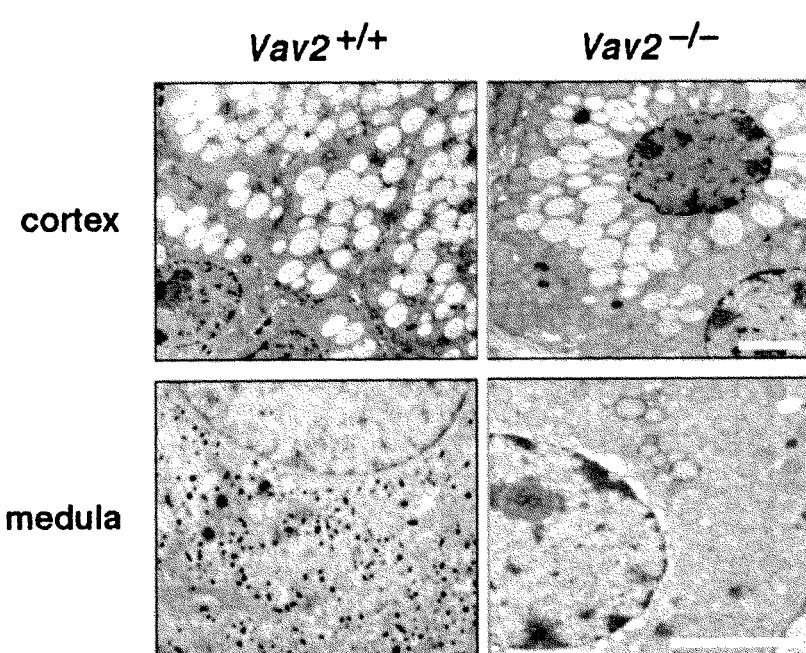


FIG. 7

A



B



C

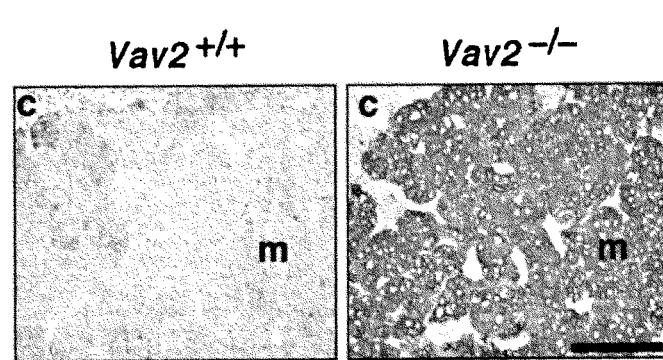


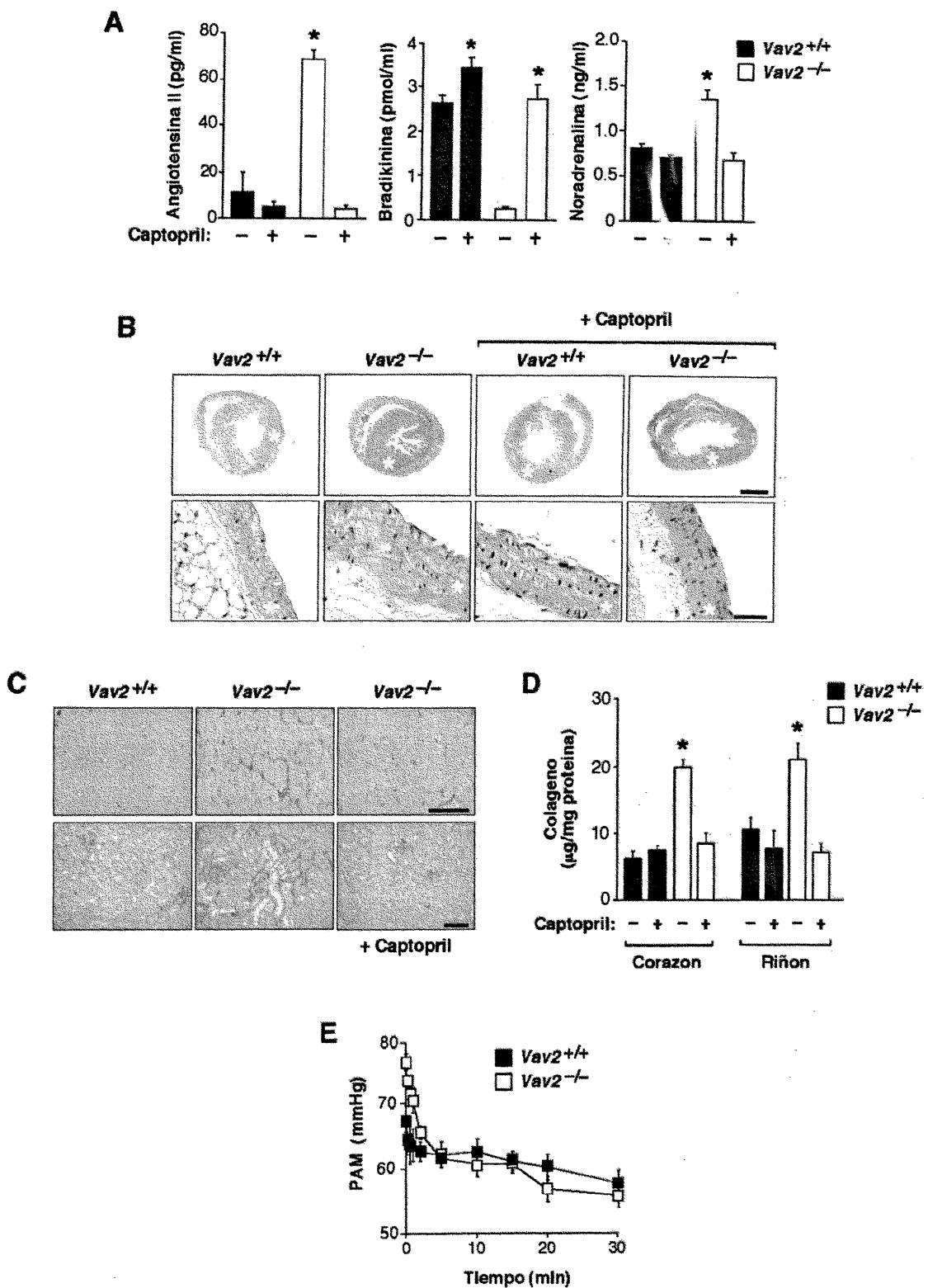
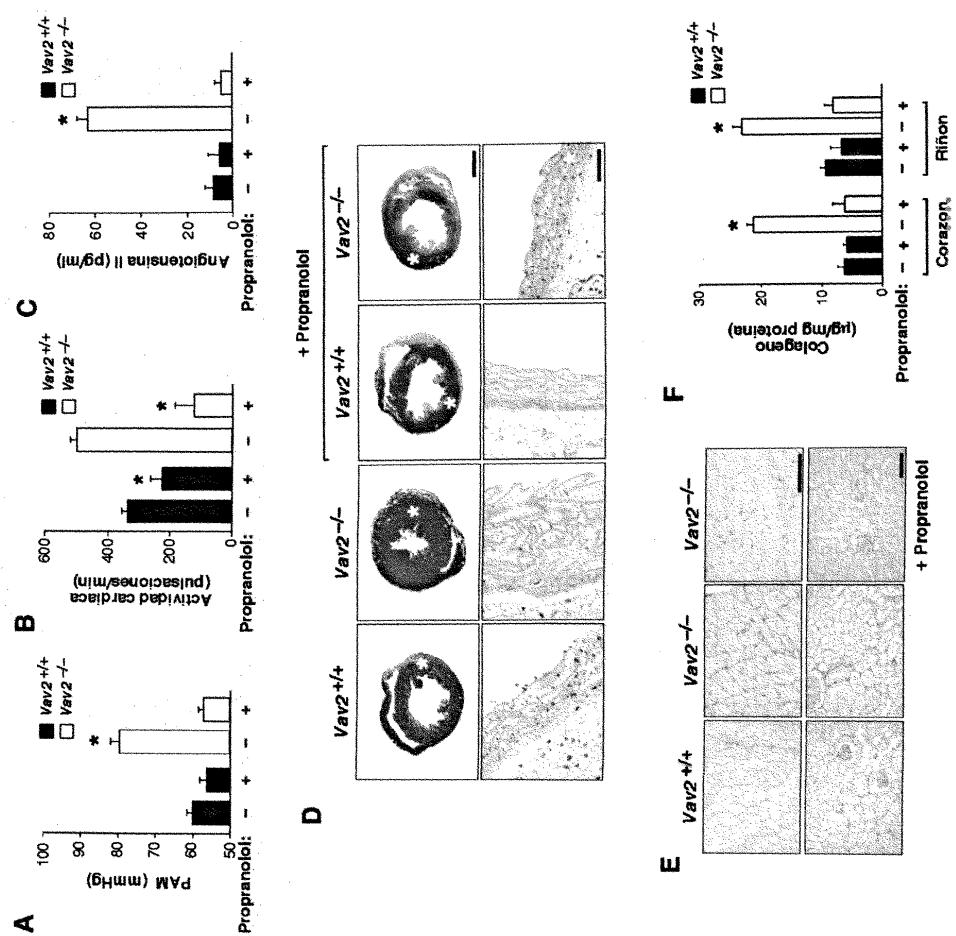
FIG. 8

FIG. 9



ES 2 303 454 B1

<220>

<223> Oligo p36b4-R

5 <400> 4

ttgatgatgg agtgtggcac c

21

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SAUZEAU V. & BUSTELO X. Abstract 754: Vav2 Deficiency Leads to an Angiotensin II- and Sympathetic-Dependent Cardiovascular Disease. Circulation. Oct. 2006, Vol 114:II, página 130, todo el documento.	1-2,4, 23-28
X	SAUZEAU V. et al. "Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction". Nature Medicine. Octubre 2006, Vol 12, páginas 841-845, todo el documento.	1-28
X	DOODY GM. et al. "Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation". Nature Immunology. 2001, Vol 2, páginas 542-547, página 542, figura 1; página 543, columna 1, párrafo 2; página 546, columna 2, párrafos 1-2.	1-2,4-16

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 01.07.2008	Examinador M ^a D. García Grávalos	Página 1/2
--	---	---------------

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200602969

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)