

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 030**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745959 .3**
96 Fecha de presentación: **11.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1405560**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **ANIMAL TRANSGÉNICO IL-18.**

30 Prioridad:
12.07.2001 JP 2001212218

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.01.2012

73 Titular/es:
Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.
27 Kanda Nishiki-cho 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8444, JP;
Nakanishi, Kenji y
Mizutani, Hitoshi

72 Inventor/es:
MIZUTANI, Hitoshi

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 372 030 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Animal transgénico IL-18

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a animales transgénicos útiles como modelos en animales de dermatitis tóxica, especialmente la dermatitis atópica crónica.

10 **Antecedentes**

Las enfermedades atópicas, tales como dermatitis atópica, asma, rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica, son enfermedades que responden con hipersensibilidad a antígenos ambientales o similares a los que los sujetos normales no responden, y desarrollan la destrucción o alteración de varios órganos por su propio sistema inmunitario. Se supone que las citocinas Th2 que potencian las respuestas alérgicas desempeñan un papel en el mecanismo de inicio de estas enfermedades. La aclaración de sus mecanismos de inducción y reguladores tiene un significado importante desde los puntos de vista de fisiología y farmacología, pero estos mecanismos todavía no se han aclarado con detalle.

20 Actualmente se sabe que los tratamientos de las enfermedades atópicas incluyen principalmente aquéllos que dependen de la evitación de antígenos o del uso de antihistamínicos que compiten con la unión de mediadores tales como la histamina a los receptores o de agentes antiinflamatorios esteroideos. No obstante, el desarrollo de procedimientos terapéuticos dirigidos a mecanismos de acción más específicos se ha dificultado debido a la falta de animales de laboratorio adecuados.

25 Convencionalmente, la inducción de una respuesta alérgica en un animal de laboratorio ha requerido la administración al animal de un antígeno o alérgeno después de sensibilizar al animal con antelación mediante inmunización repetida del animal con el antígeno o alérgeno. No obstante, en este caso, la sensibilización simultánea de muchos animales requiere una gran cantidad de trabajo y, además, puede producir variaciones en la reactividad entre cada animal individual, lo que conduce a un problema en la reproducibilidad de un experimento.

30 En los últimos años. Los ratones NC/Nga están atrayendo interés como animal modelo para la dermatitis atópica. La dermatitis que se produce en este ratón conduce a su inicio por primera vez en presencia de ácaros y, además, su velocidad de inicio es inestable y sus síntomas varían.

35 Los animales de laboratorio son indispensables para el desarrollo de medicamentos para enfermedades atópicas, lo que conduce a un fuerte y excepcional deseo de, especialmente, animales modelo para la dermatitis atópica. No obstante, actualmente no se dispone de ningún modelo animal de dermatitis atópica ni proporcionado para uso práctico, que se haya establecido en los antecedentes genéticos, se haya definido inmunológicamente y se pueda usar para el desarrollo e investigación de varios procedimientos terapéuticos y fármacos en condiciones específicas sin patógenos.

Por tanto, un objeto de la presente invención es crear un animal útil como modelo de dermatitis atópica.

45 **Divulgación de la invención**

Por consiguiente, los presentes inventores se interesaron en la interleucina 18 (IL-18). La IL-18 está sometida a procesamiento por una proteasa denominada "caspasa 1" (enzima convertidora de IL-1 β) y se convierte desde el tipo precursor en el tipo maduro. Se sabe que las funciones de la IL-18 madura incluyen (1) inducción de producción de IFN- γ , (2) potenciación de la apoptosis mediada por Fas mediante la potenciación del ligando de Fas y la expresión, (3) inducción de GM-CSF y (4) inhibición de la producción de IgE mediante la co-existencia de IL-12. Además, la IL-18 también se expresa en varios tejidos distintos a los tejidos inmunológicos, tales como células intersticiales de tipo osteoblasto, queratinocitos, células epiteliales intestinales, células adrenocorticales y pituitarias, y se ha estado realizando una investigación activa sobre sus papeles fisiológicos [véase Men-eki (Immunology) 1997-98, 62-72, Nakayama-Shoten Co., Ltd.; Rinsho Men-eki (Clinical Immunology) 30(2), 191-198 (1998); etc.]. En los últimos años, los presentes inventores han encontrado que, cuando la IL-18 se sobreexpresa únicamente, la producción de la IL-4 y la IL-13 se potencia para inducir la producción de IgE. Esto significa que la IL-18 está estrechamente relacionada con una citocina Th2 que desempeña un papel al inicio de una enfermedad atópica. Por tanto, los presentes inventores consideraron que la creación de modelos animales con secreción estimulada de caspasa 1, que convierte la IL-18 en el tipo maduro, sería útil para la aclaración de los mecanismos de inicio de enfermedades atópicas y el desarrollo de procedimientos de tratamiento para enfermedades atópicas. No obstante, la caspasa 1 es una enzima inductora de apoptosis y, por tanto, se acompaña del problema de que cuando se expresa en un cuerpo vivo a través de la introducción de su gen, no sólo se produce secreción de IL-18 sino también se desarrollan efectos apoptóticos.

65 Desde el punto de vista anterior, los presentes inventores crearon un mamífero no humano transgénico con un ADN

incorporado de modo que el gen de la caspasa 1 se expresa específicamente en la piel, y han presentado una solicitud de una patente del mismo (documento WO 01/95710 A1). Este animal transgénico muestra los síntomas de dermatitis atópica y es útil como modelo de animal. No obstante, este animal transgénico también desarrolló un síntoma de necrosis de células epidérmicas y mostró el síntoma de dermatitis de fase aguda y, en algunos casos, desarrolló hepatopatía sistémica tras infección por bacterias.

Como resultado de una investigación adicional, actualmente los presentes inventores han encontrado que la introducción directa de un ADN, obtenido mediante recombinación de la IL-18 madura de modo que la IL-18 madura se exprese específicamente en la piel, en un animal transgénico posibilita producir un animal transgénico que secreta de forma continua IL-18 madura en sangre y desarrolla el síntoma de dermatitis atópica, incluso cuando se produce en condiciones en las que se han excluido patógenos específicos, como ácaros y hongos, y, asimismo, y también que, inesperadamente, el animal transgénico carece de síntomas de necrosis de células epidérmicas y hepatopatía, y es útil como modelo de animal de dermatitis atópica más cercana a la dermatitis atópica humana, lo que conduce a la finalización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona un ratón transgénico que secreta de forma continua IL-18 madura en sangre y desarrolla continuamente dermatitis atópica, como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

La presente invención proporciona además un procedimiento de detección selectiva de una sustancia para prevenir o tratar la dermatitis atópica, que comprende administrar a un ratón transgénico una sustancia problema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para comprobar su efecto de mejora de la dermatitis atópica.

Breve descripción de las figuras

La FIG.1 ilustra esquemáticamente la estructura de unión de un ADN recombinante usado para la introducción.

La FIG. 2 muestra mediante electroforetograma los resultados de la expresión de ARNm de IL-18 madura (mIL-18) en el tejido epidérmico del oído de ratón transgénico de IL-18 específica de queratinocitos (KI-18Tg), según se analiza mediante transferencia de tipo Northern.

La FIG. 3 presenta mediante electroforetograma la expresión de ARNm de mIL-18 en el tejido epidérmico de oído de KIL-18Tg según se analiza mediante PT-PCR.

La FIG. 4 representa mediante histograma los cambios en los niveles séricos de IL-18 en KIL-18Tg, ratón transgénico con caspasa-1 específica de queratinocitos (KPASP1Tg) y el silvestre (SIL) a las 12 semanas y 36 semanas del nacimiento.

La FIG. 5 muestra mediante histograma los resultados de la prueba del número de rascados en la piel realizados por los ratones KIL-18Tg, KCASP1Tg y silvestre (SIL).

La FIG. 6 muestra mediante histograma los niveles plasmáticos de IgE en ratones KIL-18Tg, KCASP1Tg y silvestre (SIL) (a las 36 semanas).

Mejores modos de llevar a cabo la invención

El ratón transgénico de acuerdo con la presente invención comprende un ADN incorporado en sus células somáticas o células germinales, de modo que un gen de IL-18 exógena se expresa específicamente en la piel. Como gen de la IL-18 exógena, se prefiere un gen de IL-18 humano o de ratón. Son ilustrativos los genes tales como de IL-18 madura humana (hIL-18), de IL-18 de ratón maduro (mIL-18), IL-18 precursora humana (hproIL-18) e IL-18 precursora de ratón (mproIL-18). Se prefiere la h1L-18 ormlL-18, siendo particularmente preferidos los ADNc de 0,63 kb de la región codificadora completa de la mIL-18.

Como ADN con el gen de la IL-18 exógena incorporado en el mismo de modo que el gen de la IL-18 exógena se expresa de forma específica se usa un ADN recombinante que contiene el gen de la IL-18 exógena y un promotor de la queratina 14. Para la producción de la secreción de IL-18, la secuencia líder de la hormona preproparatiroidea (PTH) se liga en el gen de la IL-18. Para la expresión específica de la piel y una buena secreción de la IL-18 madura, la secuencia líder de la hormona preproparatiroidea y un gen de IL-18 se ligan en un lugar posterior a un promotor de la queratina. Por otro lado, para mejorar la eficiencia de la expresión del gen se prefiere ligar un intrón, como el intrón de la β -globina.

El ADN descrito anteriormente puede tener, preferentemente, una secuencia ("poli A", en general denominada "terminadora"), que termina la transcripción de un ARN mensajero diana en un mamífero transgénico, y, usando las secuencias de genes individuales derivados de virus o de varios mamíferos, se puede, por ejemplo, manipular la expresión de los genes. Preferentemente se usan las poli A de las proteínas específicas de piel descritas anteriormente, siendo particularmente preferida la poli A de la queratina o similar. Adicionalmente, para los fines de proporcionar una expresión todavía mayor del gen diana, la señal de corte y empalme y la región potenciadora de cada gen y una porción del intrón de un gen eucariótico se pueden ligar en 5' de la región promotora o entre la región promotora y la región de traducción o en 3' de la región de traducción.

El mamífero no humano usado para introducir el ADN recombinante obtenido tal como se ha descrito anteriormente es un ratón.

5 El ratón transgénico de acuerdo con la presente invención se puede crear mediante, por ejemplo, introducción de un ADN, en el que se ha incorporado el gen de la IL-18 exógena mencionada anteriormente para expresar específicamente en la piel el gen de la IL-18 exógena, en un huevo fertilizado de un ratón e implantando el huevo fertilizado en un ratón hembra. Como hueco fertilizado se prefiere uno en un estadio de pronúcleo macho (aproximadamente 12 horas después de la fertilización). Ejemplos de un procedimiento de transfección del ADN recombinante pueden incluir transfección con fosfato cálcico, el procedimiento del pulso eléctrico, lipofección, 10 aglutinación, microinyección, el procedimiento de disparo de partículas y transfección con DEAE-dextrano, siendo particularmente preferida la microinyección.

15 El huevo fertilizado transfeccionado con el ADN recombinante se implanta en una hembra de la misma especie de animal que el huevo fertilizado. Como procedimiento de implantación se prefiere el trasplante artificial y la implantación en el oviducto de un animal hembra seudopreñada. A partir de la descendencia nacida el animal con huevos fertilizados implantados en el mismo como se ha descrito anteriormente, uno o más individuos en cada uno de los cuales se ha expresado el gen diana se puede criar por generaciones.

20 La confirmación en lo que respecta a si cada animal transgénico así obtenido contiene o no el gen diana se puede conseguir recogiendo su ADN de la piel y realizando un análisis para el gen transfeccionado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transferencia de tipo Southern.

25 El ratón transgénico de acuerdo con la presente invención obtenido como se ha descrito anteriormente muestra que, porque el gen de la IL-18 exógena se expresa en la piel, desarrolla un síntoma de dermatitis atópica incluso en condiciones específicas sin patógenos y también sobrevive durante un periodo prolongado.

30 Descrito específicamente, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención tiene el gen de la IL-18 exógena en únicamente la piel y no la tiene en otros tejidos, por ejemplo el hígado, los riñones, los pulmones, el cerebro y el bazo. Como /MoP[™], una consecuencia, la IL-18 madura se secreta abundantemente en la piel del ratón transgénico de acuerdo con la presente invención. Además, la IL-18 madura está contenida en gran cantidad en la sangre del ratón transgénico de acuerdo con la presente invención con respecto a las de los ratones normales.

35 El ratón transgénico de acuerdo con la presente invención muestra un síntoma de dermatitis atópica, por ejemplo dermatitis de tipo liquen o dermatitis erosiva desde aproximadamente sus 24 semanas de edad. De estos, el síntoma de dermatitis de tipo liquen se desarrolla como una característica más distintiva en el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención que en el ratón transgénico con caspasa 1 descrito anteriormente, lo que indica que el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención desarrolla un síntoma más cercano al de la dermatitis crónica humana.

40 De acuerdo con una observación de los tejidos de la piel bajo un microscopio óptico, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención desarrolla una alteración, tal como inflamación asociada con hiperqueratosis o acantosis, sobre la epidermis gruesa alrededor de una úlcera desde aproximadamente sus 24 semanas de edad y en la dermis en cada lesión se produce infiltración de monocitos y de mastocitos. No obstante, sustancialmente no se produce necrosis de células epidérmicas. Además, sustancialmente no se observa hepatopatía sobre el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención. En general tampoco se observa necrosis de las células epidérmicas ni hepatopatía con la dermatitis atópica humana, se aprecia que el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención muestra un síntoma extremadamente cercano a la dermatitis atópica humana.

45 Además, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención repite el comportamiento de rascado de piel con extremada frecuencia en comparación con los ratones normales y el ratón transgénico con la caspasa 1 descrito anteriormente, y, por tanto, se entiende que se acompaña de un fuerte picor típico de la dermatitis atópica. Además, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención muestra un síntoma característico de la dermatitis atópica, que los niveles de histamina e IgE en sangre son extremadamente altos.

50 Como se aprecia fácilmente a partir de lo anterior, el ratón transgénico de acuerdo con la presente invención desarrolla un síntoma de dermatitis atópica en condiciones específicas sin patógenos y, por tanto, es útil como modelo de síntomas de la dermatitis atópica. De acuerdo con esto, la detección selectiva de una sustancia para prevenir o tratar la dermatitis atópica es factible siempre que una sustancia de prueba se administre al ratón transgénico o a su descendencia de acuerdo con la presente invención para comprobar su efecto de mejora de la dermatitis atópica. Este efecto de mejora de la dermatitis atópica se puede analizar haciendo un uso único o un uso 60 adecuadamente combinado de la medición de los niveles en sangre de IL-18 madura, detección de IL-18 madura en la piel, observación visual, observación microscópica de un tejido de piel, medición de los niveles de histamina en sangre y procedimientos similares, como se ha descrito anteriormente. Además, cualquier sustancia de prueba que mediante detección selectiva se determine que posee efecto de mejora de la dermatitis atópica es útil como fármaco 65 para la prevención o tratamiento de la dermatitis atópica.

Ejemplos

A continuación se describirá con mayor detalle la presente invención en base a los ejemplos. No obstante, se debe tener en cuenta que la presente invención no está, de ningún modo, limitada a los Ejemplos siguientes.

5 En primer lugar se realizará una descripción sobre varios procedimientos de prueba y materiales empleados en los ejemplos.

(1) Transferencia de tipo Northern

10 El ADNc de mL-18 se obtuvo de Hyogo College of Medicine (Dr. Okamura) [Nature 378, 88-91, (1995)]. De tejidos de un ratón transgénico con Mil-18 (KIL-18Tg), que se obtuvo en el Ejemplo 1 que se va a describir después e el presente documento, y un ratón control, se extrajo el ARN total usando el reactivo "Isogen Reagent" (producto de Nippon Gene Co., Ltd.). En un análisis de transferencia de tipo Northern, el ARN total (10 µg) se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en 2 % en peso de gel de formaldehído/agarosa. El ARN se transfirió a una membrana de nylon ("Immobilon-N", producto de Millipore Corporation) y como sonda se usó el ADNc marcado con ³²P correspondiente a la IL-18 de ratón. Después de la hibridación, la transferencia se lavó a 42 °C dos veces con 1 x SSC/0,1 % en peso de SDS y dos veces con 2 x SSC/0,1 5 en peso de SDS. Después, los puntos de transferencia se expusieron a -70 °C a una película de rayos X.

(2) Cito cimas, ensayos de citocinas y anticuerpos

25 La actividad biológica de la IL-18 se analizó en términos de actividad inductora de IFN-γ usando células NK de ratón respondedoras a IL-18. La IL-18 de ratón recombinante (rmIL-18), un anticuerpo neutralizante de IL-18 anti-ratón de conejo y un kit de ELISA para IL-18 de ratón se obtuvieron de Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Con el un kit de ELISA para IL-18 de ratón se pudieron detectar de 10 a 1.000 pg/ml de IL-18.

(3) Inmunohistoquímica

30 Las muestras para biopsia de los ratones transgénicos y silvestres se fijaron durante 2 horas con una solución de formaldehído tamponada con fosfato, después se cortaron en láminas de parafina. Las muestras se congelaron inmediatamente en "Compuesto OCT" (producto de Miles Inc.), una matriz de tejido congelado, y se almacenaron a -70 °C. Las secciones criocongeladas (5 µm) se fijaron a 4 °C durante 5 minutos en acetona y se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo primario diluido adecuadamente. Después de lavar, el anticuerpo primario unido se visualizó con AEC (producto de DAKO JAPAN CO., LTD.) como sustrato usando al mismo tiempo el kit ("Vectastain Elite Kit" (producto de Vector Laboratories, Inc.).

(4) Inmunotransferencia

40 La inmunotransferencia se realizó siguiendo J. Clin. Invest. 87, 1066 (1991). Después de extraer el ADN y el ARN usando el kit "Isogen Kit", un lisado de células epidérmicas de los ratones transgénico y control se suspendió con tampón de muestra-SDS en condiciones reductoras. Las proteínas sometidas a electroforesis se transcribieron a una membrana de nitrocelulosa (producto de Scheicher & Schuell GmbH) usando un sistema de transferencia semiseca (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Tras la incubación de la membrana con el anticuerpo primario durante 45 hora, se sometió a las proteínas a incubación secundaria con IgG anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina o anticuerpo IgG anti-conejo y, por último, se visualizaron con un sustrato Western Blue (producto de Promega Corporation).

Ejemplo 1

50 **(1) Estructura del ADN y generación de ratones transgénicos**

ADNc de 0,63 kb de la región codificadora completa de Mil-18, en el que dicho ADNc se ha ligado con la secuencia líder de la hormona preproparatiroidea (PTH) obtenida del Dr. Tahara, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo [véase, Genetherapy 6, 808-815 (1999)], se ligó mediante ligadura de extremos romos al promotor de la queratina 14 [obtenido del Dr. Fuchs, The University of Chicago; véase Nature 374, 159 (1995)] y el intrón de la β-globina de conejo [obtenido del Dr. Tanaka, Kyoto University; véase Nature 374, 159 (1995)] (FIG. 1 En la FIG. 1 "promotor K14" indica el promotor de queratina 14, "intrón de β-globina", el intrón de la β-globina de conejo, "PTH-mIL-18" el ADNc de 0,63 kb de la región codificadora completa de la mL-18 ligada con PTHA y "poli a de K14", la poli a de la queratina humana). Tras el procedimiento descrito en Dev. Growth Differ. 39, 257 (1997), el fragmento de ADN resultante se inyectó en huevos fertilizados de un ratón C57BL/L6 (Charles River Japan, Inc.) mediante microinyección..

65 **(2) Confirmación de la sobreexpresión de mL-18 en la piel de ratones transgénicos**

Dependiendo de la presencia del gen transfeccionado mediante PCR y transferencia de tipo Southern usando ADN de la piel caudal se sometió a la descendencia a detección selectiva. De los 50 ratones nacidos en total, dos ratones (2 machos) fueron transgénicos para mL-18 (en lo sucesivo abreviado a "KIL-18Tg"). KIL18Tg eran sanos desde el momento del nacimiento y crecieron con normalidad. Antes de las 24 semanas de edad, eran un poco más pequeños que sus hermanos silvestres. Después de dicho punto temporal, en KIL-18Tg, claramente se desarrolló un síntoma de dermatitis activa crónica. Como resultado del cruce de dichos dos machos KIL-18Tg con dos hembras silvestres nació una descendencia KIL-18Tg y silvestre en una proporción macho:hembra de 1:1. Todos los experimentos se realizaron, cada uno, mediante una comparación entre hermanos no transgénicos o silvestres y heterocigotos con el gen transfeccionado pasado por generaciones.

(3) Afecciones de la piel

En el caso de KIL-18Tg, desde las 24 semanas de edad en las condiciones de que no se detectó ningún patógeno concreto, la dermatitis moderada alrededor de los ojos se convirtió en profunda y, después, rápidamente progresión a dermatitis extensa. En varias semanas posteriores los síntomas se extienden a la cara, las orejas, el cuello, el cuerpo y las patas. La inflamación de la piel se convirtió en crónica, de modo que la dermatitis cutánea continuó. El pelo de la cara, el tronco y las extremidades se perdió con muchos indicios de rascados.

A nivel de un microscopio óptico no se observó ninguna alteración histomorfológica concreta sobre la piel de KIL-18Tg hasta las 24 semanas. No obstante, sobre la epidermis gruesa en las lesiones de KIL-18Tg de 28 semanas de edad se observaron alteraciones similares a eccema crónico acompañadas de liquenificación. Las dermis en las lesiones estaban infiltradas con numerosos monocitos y mastocitos. No se observó necrosis de las células epidérmicas.

Se detectaron niveles altos de IL-18 en los tejidos epidérmicos gruesos de KIL-18Tg. Por otro lado, en los ratones control se detectó IL-18 únicamente indicios.

(4) Detección de IL-18 madura en la piel

Mediante análisis de transferencia de tipo Northern y RT-PCR se midió el ARNm de mL-18 en el tejido epidérmico de oído, epidérmico dorsal, e hígado, riñones, colon, pulmones, cerebro y bazo de cada KIL-18Tg. Como resultado, se confirmó que existía ARNm de 0,63 kb de Mil-17 únicamente en las superficies del oído y dorsal de KIL-18Tg, pero no se confirmó que existiera en otros tejidos (hígado, riñones, colon, pulmones, cerebro y bazo) (véanse las FIG. 2 y 3). En la FIG. 2, la calle 1 muestra los resultados de la detección de ARNm en el tejido epidérmico del oído de una de KIL-18Tg, mientras que la calle 2 indica los resultados de la detección de ARNm en el tejido epidérmico del oído de uno de sus hermanos no transgénicos (silvestres). Por otro lado, en la FIG. 3, la calle 2 corresponde a λ Hind, la calle 2 a KIL-18Tg, la calle 3 a un ratón normal y la calle 4 a un control positivo.

(5) Nivel de IL-18 en sangre

Se realizó una investigación sobre si la activación no localizada de IL-18 por una IL-18 exógena daría como resultado o no la acumulación sistémica de citosina madura. Como se muestra en la FIG. 4, niveles altos de existencia de IL-18 se reconocieron de forma significativa en los sueros de KIL-18Tg a las 12 semanas y a las 36 semanas del nacimiento. En contraste con ello, el nivel de IL-18 en suero permaneció bajo en los hermanos silvestres (SIL) durante toda su vida (0,1 ng/ml o menores). El nivel de IL-18 en suero de cada KIL-18Tg conservó un valor alto. La FIG. 4 también muestra los niveles en suero de IL-18 de un ratón transgénico con un ADN incorporado de modo que el gen de la caspasa 1 se expresaría específicamente en la piel (véase el documento WO 01/95710A1, KCASP1Tg). Los niveles de IL-18 en suero de cada KIL-18Tg fueron extremadamente más altos que los de KCASP1Tg.

Para determinar que la IL-18 en el suero de KIL-18Tg es IL-18 madura, la IL-18 en el suero de KIL-18Tg se investigó para determinar las actividades biológicas. Como resultado, se descubrió que el suero de KIL-18Tg tenía la capacidad de inducir producción de células natural killer (asesinas naturales) IFN- γ clonadas con capacidad de respuesta de IL-18. Además, esta capacidad de inducción de IFN- γ se inhibió completamente con el anticuerpo anti-IL18 (anticuerpo neutralizante). Esto significa que el suero de KIL-18Tg contiene IL-18 activa. No obstante, no se detectó IFN- γ en el suero de KIL-18Tg en estado estacionario. Como se aprecia a partir de lo anterior, KIL-18Tg secretó de forma continua IL-18 madura en sangre circulante.

(6) Comportamiento de rascado de la piel por ratones transgénicos

El número de rascados de piel por KIL-18Tg y de ratones silvestres (ratón C57BL/L6) se contó visualmente durante 60 minutos.

Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5, el número de rascados en los ratones silvestres fue de 50 episodios o menos por 10 minutos, mientras que en los ratones KIL-18Tg fue de 300 episodios o más por 10 minutos. Por tanto, se descubrió que se producía dermatitis grave asociada con picor en el ratón transgénico de acuerdo con la

presente invención. Además, el número de episodios de rascado por KIL-18Tg fue mayor que por KCASP1Tg.

(7) Nivel de IgE en sangre

- 5 Los niveles de IgE en sangre (ELISA) de KIL-18Tg y de los ratones silvestres se midieron a las 36 semanas de edad. Los resultados se muestran en la FIG. 6. A partir de los resultados se entiende que, en el caso del ratón transgénico de acuerdo con la presente invención, los niveles de IgE en sangre alcanzan los 120 $\mu\text{m}/\text{mm}$ o más, es decir un valor extremadamente alto a las 36 semanas de edad. Además, los niveles de IgE en sangre de cada KIL-18Tg fueron extremadamente más altos que los de KCASP1Tg.

10

Aplicabilidad industrial

El ratón transgénico de acuerdo con la presente invención desarrolla de forma espontánea dermatitis atópica en condiciones específicas son patógenos y, por tanto, es útil como modelo animal de la enfermedad. El uso del animal transgénico de acuerdo con la presente invención posibilita desarrollar fármacos para prevenir o tratar la dermatitis atópica mediante inmunidad natural, así como aclarar los mecanismos de inicio de las enfermedades atópicas.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ratón transgénico que secreta de forma continua IL-18 madura en sangre y que desarrolla de forma continua dermatitis atópica, que comprende un ADN en el que una secuencia líder de hormona preproparatiroidea ligada a un gen de la IL-18 está ligada en una posición posterior de un promotor de queratina 14, de modo que dicho gen de IL-18 exógena se expresa de forma específica.
- 10 2. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADN recombinante contiene además un intrón de β -globina y una poli A de queratina.
3. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que no desarrolla prácticamente necrosis de células epidérmicas ni hepatopatía.
- 15 4. Un procedimiento de detección selectiva de una sustancia para prevenir o tratar la dermatitis atópica, que comprende administrar a un ratón transgénico una sustancia de prueba de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para comprobar su efecto de mejora de la dermatitis atópica.

Fig. 1

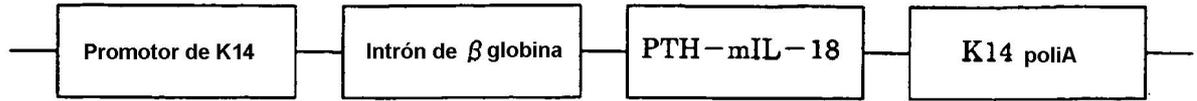


Fig. 2

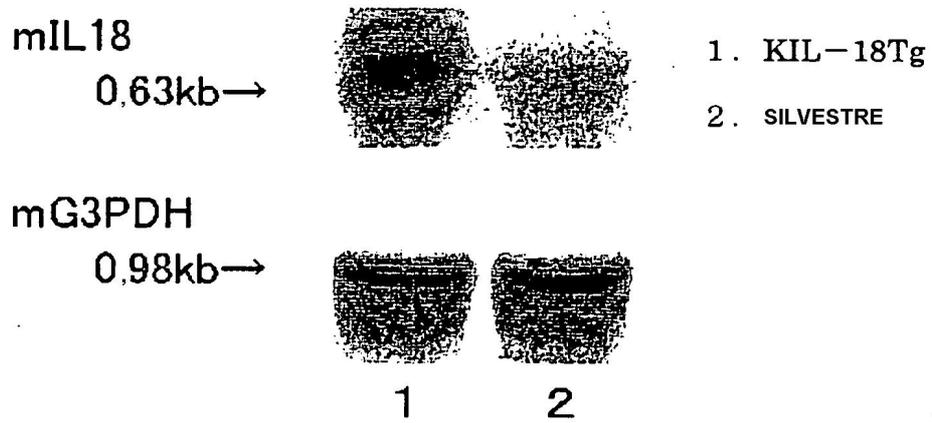
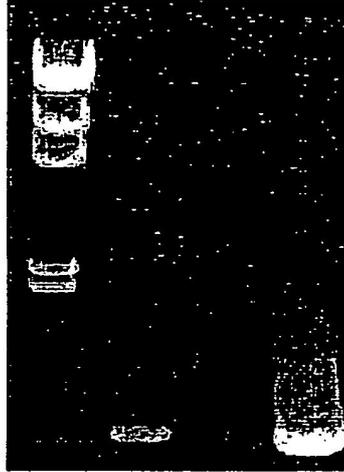


Fig. 3

A.



A. PCR de PTH-IL18 RT

B. mG3PDH

1. λ Hind

2. KIL-18Tg

3. Normal

4. Control positivo de PCR

B. 0,98kb →

1 2 3 4

Fig. 4

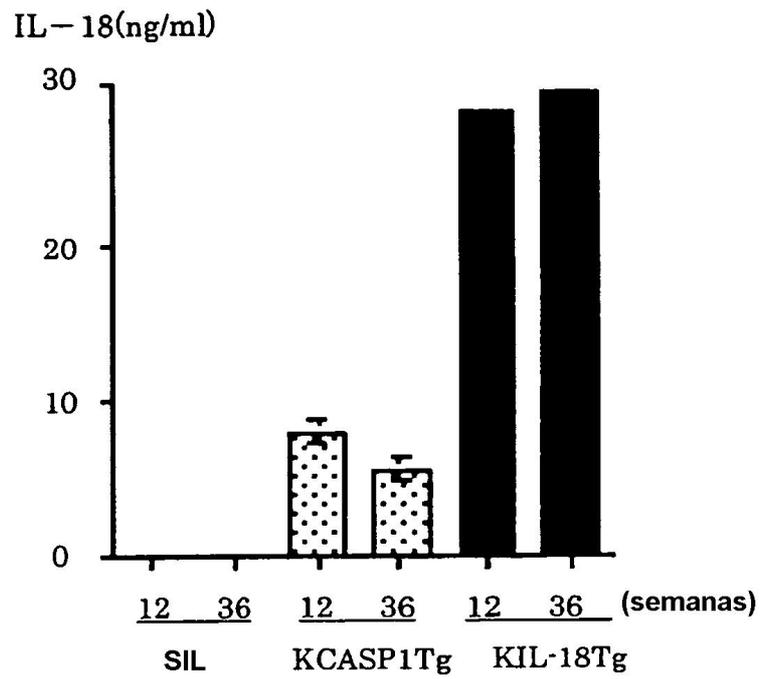


Fig. 5

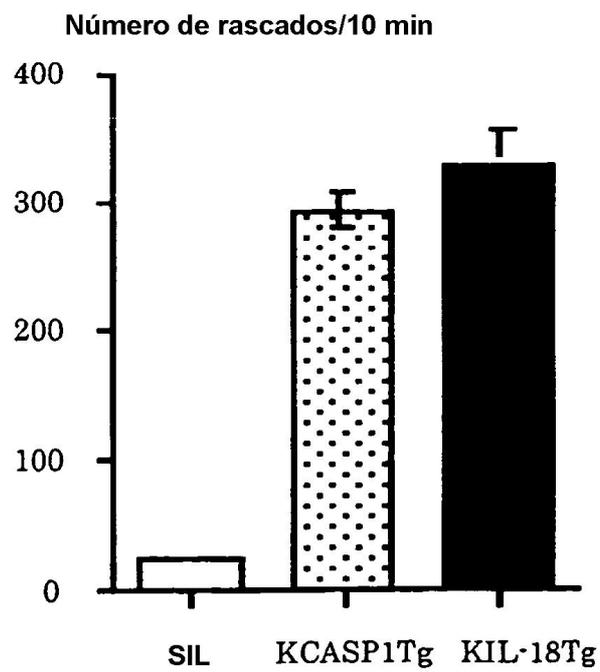


Fig. 6

