

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 287**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05706932 .0**
96 Fecha de presentación: **20.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1711052**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Modelo de ratón para soriasis y artritis sorriática**

30 Prioridad:
21.01.2004 EP 04001181

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2012

73 Titular/es:
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH
CD PATENTS, BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM, DE**

72 Inventor/es:
**WAGNER, Erwin y
ZENZ, Rainer**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 386 287 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelo de ratón para soriasis y artritis sorriática.

La invención se refiere al campo de la soriasis.

La soriasis, que afecta a aproximadamente el 2% de la población, es uno de los trastornos de la piel humana más comunes que afecta a la piel y a las articulaciones. Se caracteriza por complejas alteraciones de diversos tipos celulares. Entre ellas se incluyen la hiperproliferación epidérmica y alteraciones de la diferenciación, así como angiogénesis y dilatación de los vasos sanguíneos dérmicos (Schön, 1999; Lebwohl, 2003). Además, se observa un infiltrado leucocítico mixto. Está compuesto de linfocitos T activados, neutrófilos dentro de la dermis y microabscesos epidérmicos, macrófagos de revestimiento y un número incrementado de mastocitos dérmicos. Las citoquinas, entre ellas el factor α de necrosis tumoral (TNF- α), la interleuquina-1 (IL-1), el interferón γ (INF- γ), IL-6, IL-8, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor α de crecimiento transformante (TGF- α) se cree que median en las alteraciones del tejido psoriático (Schön, 1999).

Durante décadas la controversia ha sido si la soriasis resulta de anomalías primarias en la epidermis o si presenta una base inmunológica (Nickoloff *et al.*, 2000). Aunque se acumula la evidencia de que presenta una base inmunológica, otros autores interpretan que la soriasis es un patrón de respuesta epitelial anormal determinado genéticamente frente a la infección y/o a insultos físicoquímicos a la piel.

Se ha puesto de manifiesto que la piel sorriática es un caldo de cultivo de factores de crecimiento epidérmico y mediadores inflamatorios. La evidencia en apoyo de un papel crucial para dichos mediadores procede de pacientes que responden a las terapias inmunosupresoras, antiinflamatorias y antiproliferativas, tales como ciclosporina, metotrexato, tacrolimus, corticoesteroides y psoralén activado por luz ultravioleta. Sin embargo, los grandes esfuerzos destinados a dirigir mediadores inflamatorios y factores de crecimiento de los queratinocitos a la piel no han reproducido por completo el fenotipo sorriático (Xia *et al.*, 2003), que de esta manera hasta el momento sólo ha sido modelado fielmente en animales mediante trasplante de piel sorriática a ratones con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Hasta el momento ningún modelo de ratón informado imita todas las características observadas en la soriasis en el ser humano, incluyendo la artritis sorriática, que se encuentra presente en hasta 40% de los pacientes de soriasis.

Debido a que no existe ninguna enfermedad de la piel animal de origen natural que sea similar tanto en fenotipo como en inmunopatogénesis a la soriasis, la investigación sobre la patogénesis de este trastorno común de la piel se ha visto severamente dificultada.

En consecuencia, existe una necesidad de un modelo animal eficiente y significativo para el estudio de la soriasis y para el ensayo de candidatos a fármacos efectivos en el tratamiento de este trastorno.

Es un objetivo de la invención proporcionar un modelo animal para la soriasis, incluyendo la artritis sorriática.

La solución del problema subyacente a la invención se basa en los mecanismos moleculares asociados al factor de transcripción AP-1.

El factor de transcripción AP-1 es generado por una serie de dímeros de productos de las familias de proteínas Fos, Jun y CREB/ATF (Eferl y Wagner, 2003), así como por otras proteínas bZip. Además, se han observado asociaciones entre Fos o Jun y la subunidad p65 de NF κ B (Stein *et al.*, 1993) y ATF-2 y p50-NF κ B (Du *et al.*, 1993). La asociación combinatorial puede utilizar algunos de los genes siguientes: los tres genes Jun (c-Jun, JunB, JunD), los cuatro genes Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2) y algunos de los genes CREB/ATF. A pesar del elevado grado de homología de las características estructurales globales, los diferentes miembros de las familias de Fos, Jun y CREB muestran diferencias significativas, que conducen a diferencias sutiles de unión y activación transcripcional del ADN (Angel y Herrlich, 1994), sugiriendo funciones específicas en la regulación génica para los dímeros individuales. Los miembros de la familia de AP-1 participan en el control de la proliferación celular, así como en diversos tipos de diferenciación, y también en la función neural y las respuestas al estrés. AP-1 es uno de los factores clave que traduce los estímulos externos en cambios de expresión génica tanto a corto plazo como a largo plazo.

El factor de transcripción c-Jun interactúa con factores de transcripción relacionados y no relacionados, ganando influencia sobre rutas de señales diferentes y aparentemente no relacionadas que controlan diversos genes diana. c-Jun recibe el input regulador originado en el exterior de la célula, atravesando la membrana plasmática, el citoplasma y la cubierta nuclear en una cascada de reacciones bioquímicas (Herrlich y Ponta, 1989; Ransone y Verma, 1990; Karin y Smeal, 1992). Estas señales pueden modificar la transcripción del gen c-Jun o afectar a la actividad de la proteína c-Jun post-traduccionalmente. La regulación del potencial de transactivación de c-Jun tiene lugar a dos niveles diferentes: la fosforilación incrementada del dominio de transactivación causa un incremento de la actividad transcripcional, y el incremento de la unión al ADN se debe a la desfosforilación de la región de unión al ADN (Sachsenmaier y Radler-Pohl, 1994). Las células de mamífero no estimuladas contienen cantidades bajas, aunque detectables, de proteína c-Jun. En este estado, c-Jun se fosforila constitutivamente en las serinas y

treoninas próximas a su dominio C-terminal de unión al ADN. La fosforilación en esta región reduce marcadamente la unión al ADN y la capacidad de transactivación de c-Jun *in vitro* (Boyle *et al.*, 199) e *in vivo* (Lin *et al.*, 1992). En contraste con el efecto negativo de la hiperfosforilación sobre la unión del ADN, el incremento de la fosforilación en el extremo N-terminal resulta necesario para la activación de la función de transactivación de c-Jun. Las serinas 73 y 63 se localizan en una posición próxima a un tramo de aminoácidos descrito como la "región rica en prolinas", que resulta necesaria para la transactivación y que puede servir como sustrato *in vitro* para las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAP) (Pulverer *et al.*, 1991). La regulación transcripcional por parte de c-Jun es altamente dependiente del tipo celular (Imler *et al.*, 1988; Bohmann y Tjian, 1989; Baichwald y Tjian, 1990) debido a los diferentes activadores situados cadena arriba, moléculas asociadas o dianas situadas cadena abajo y presentes en los diferentes tipos celulares. Se ha propuesto un papel funcional para c-Jun en la piel en la diferenciación y la carcinogénesis. Debido a que los ratones con inactivación de c-Jun no son viables (Johnson *et al.*, 1993; Hilberget *et al.*, 1993), sólo han podido investigarse las consecuencias de la falta de c-Jun durante el desarrollo y para la carcinogénesis de la piel mediante la generación de ratones con inactivación condicional de c-Jun (c-Jun^{Δep}) (Zenz R. *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Los ratones que no presentan c-Jun en los queratinocitos (c-Jun^{Δep}) desarrollan una piel normal pero expresan niveles reducidos de EGFR en los párpados, conduciendo a que nazcan con los ojos abiertos, tal como se observa en los ratones con mutación de anulación de EGFR. Los queratinocitos primarios de ratones c-Jun^{Δep} proliferan mal, muestran una diferenciación incrementada y forman haces de actina cortical prominentes, muy probablemente debido a la menor expresión de EGFR y su ligando HB-EGF. En ausencia de c-Jun, los ratones transgénicos K5-SOS-F con tendencia a la tumoración desarrollan papilomas de menor tamaño, con una expresión reducida de EGFR en los queratinocitos basales. De esta manera, mediante la utilización de tres sistemas experimentales los presentes inventores demostraron que EGFR y HB-EGF se encuentran regulados por c-Jun, que controla el desarrollo de los párpados, la proliferación de los queratinocitos y la formación de tumores en la piel.

Todas las proteínas Jun (c-Jun, JunB y JunD) son similares con respecto a su estructura primaria y su especificidad de unión al ADN. Sin embargo, JunB, debido a un pequeño número de cambios de aminoácidos en su región básica de cremallera de leucinas muestra una actividad de unión al ADN 10 veces más débil y una propiedad de homodimerización reducida en comparación con c-Jun. Los estudios de transfección sugieren que JunB es un represor de la transactivación y transformación mediadas por AP-1, muy probablemente debido a la formación preferente de dímeros c-Jun/JunB inactivos (Chiu *et al.*, 1989; Deng y Karin, 1993). Sin embargo, los datos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que JunB también puede ser un transactivador fuerte dependiendo tanto de la pareja de interacción como el contexto del promotor (Chiu *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1999).

Debido a que los ratones con inactivación de JunB no son viables (Schorpp-Kistner *et al.*, 1999), las consecuencias de la falta de JunB sobre el desarrollo y carcinogénesis de la piel sólo pueden investigarse mediante la generación de ratones con inactivación condicional de JunB (JunB^{Δep}).

Dependiendo del sistema experimental, se creía que c-Jun y JunB presentaban funciones opuestas en la regulación de la expresión génica, influyendo de esta manera sobre el resultado biológico de diversas señales externas e internas que inducen la actividad de AP-1. Para verificarlo, en los experimentos que condujeron a la invención, se utilizó un nuevo sistema experimental mediante la generación de ratones con doble inactivación específicamente en los queratinocitos, deficientes en c-Jun y JunB (c-Jun^{Δep}, JunB^{Δep}). Inesperadamente, estos ratones murieron poco después del nacimiento, impidiendo el análisis de los fenotipos en estadios posteriores del desarrollo de estos ratones.

Por lo tanto, en los experimentos descritos en la invención, se generó un ratón con inactivación condicional inducible que era deficiente para c-Jun y JunB en los queratinocitos.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un ratón que es deficiente en c-Jun y en JunB en los queratinocitos debido a la delección de los genes de C-Jun y JunB en los queratinocitos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un ratón transgénico en el que la delección de los genes c-Jun y JunB ha sido inducida en los queratinocitos mediante la expresión de un enzima de recombinación inducible en los queratinocitos.

En aras de la claridad, la terminología y abreviaturas utilizadas en la presente memoria presentan los significados siguientes:

c-Jun^{ff}, JunB^{ff} o c-Jun^{ff}, JunB^{ff}, respectivamente, se refiere a ratones con un locus c-Jun o JunB flanqueado por sitios loxP ("floxado") o ratones con los loci c-Jun y JunB floxados, respectivamente.

c-Jun^{ff} K5-Cre-ER (o JunB^{ff} K5-Cre-ER o c-Jun^{ff}, JunB^{ff} K5-Cre-ER, respectivamente) se refiere a los ratones floxados, en los que el gen o genes respectivos no han sido delecionados (todavía), debido a que resulta necesario activar Cre en primer lugar. La activación de Cre, y en consecuencia la delección del gen o genes, se consigue mediante la aplicación de tamoxifeno(los ratones c-Jun^{ff}, JunB^{ff} K5-Cre-ER son representativos de los ratones

anteriormente definidos, en los que la delección de c-Jun y JunB puede inducirse específicamente en los queratinocitos).

c-Jun^{fl/fl}K5-Cre (o JunB^{fl/fl} K5-Cre o c-Jun^{fl/fl}, JunB^{fl/fl} K5-Cre, respectivamente) se refiere a ratones en los que el gen o genes respectivos han sido delecionados en los queratinocitos (Cre se encuentra en el estado activo). Los ratones c-Jun^{fl/fl}, JunB^{fl/fl} K5-Cre son representativos de los ratones anteriormente definidos, que son deficientes para c-Jun y JunB en los queratinocitos de la epidermis (dichos ratones también se denominan "ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}").

Los constituyentes K5, Cre y ER pueden sustituirse por cualquier otro promotor adecuado específico de queratinocitos, un enzima de recombinación o un gen codificante de una molécula biológica, respectivamente, los cuales, tras la unión de su ligando, induzcan la activación del enzima de recombinación, por ejemplo otro receptor hormonal, tal como el dominio de unión a receptores de la progesterona, que se activa con la unión de una antiprogestina, por ejemplo RU486 (Minamino *et al.*, 2001).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a métodos para generar ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}, según las reivindicaciones.

El principio de métodos adecuados se basa en protocolos conocidos para generar ratones transgénicos, preferentemente utilizando tecnología de células madre embrionarias (ES). Las características esenciales de los métodos preferentes adecuados para obtener los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} de la invención son, por una parte, que los genes c-Jun y JunB se encuentren flanqueados por sitios de reconocimiento para un enzima de recombinación (recombinasa) específico de sitio y, por otra parte, que la recombinase se haya obtenido mediante cruce del ratón con inactivación condicional con un ratón transgénico que expresa una recombinasa inducible en los queratinocitos. La expresión específica en los queratinocitos puede conseguirse mediante la utilización de un promotor específico de los queratinocitos; son ejemplos de promotores adecuados, K5, K6, K10 ó K14 (Jiang *et al.*, 1991).

En los experimentos que describe la invención, se utilizó el sistema de delección génica inducible que permite deleccionar ambos genes en los ratones adultos, tal como describen Vasioukhin *et al.*, 1999. Este sistema permite evitar la letalidad post-natal de los ratones Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}, que no permitiría el análisis de los fenotipos en estadios posteriores del desarrollo. Este sistema utiliza una línea de ratón transgénico K5-Cre-ER, que expresa una fusión de recombinasaCre-receptor de estrógenos bajo el control del promotor de queratina 5 (K5) específico de los queratinocitos, específicamente en los queratinocitos. Mediante la utilización de este sistema pueden deleccionarse ambos genes en los ratones adultos mediante inyección intraperitoneal consecutiva de tamoxifeno (Brocard *et al.*, 1999; Vasioukhin *et al.*, 1999). En los queratinocitos que expresan la proteína de fusión Cre-ER, el tamoxifeno, un anti-estrógeno, se une al dominio mutado del receptor de estrógeno. Esta proteína de fusión mutada no se une al 17β-estradiol, mientras que se une al ligando sintético tamoxifeno (Danielian *et al.*, 1993). La unión del tamoxifeno induce un cambio conformacional de la estructura de la proteína, conduciendo a una recombinasaCre activa. La recombinasaCre activa es transportada al núcleo y deleciona las secuencias de ADN entre los 2 sitios loxP (gen flojado).

Para obtener los ratones con doble inactivación específica de los queratinocitos de la invención, deficientes tanto en c-jun como JunB, según una realización preferente se utiliza el sistema inducible loxP/Cre. Hasta el momento se considera que este sistema es el diseño experimental más fiable para la delección *in vivo* de genes somáticos específica de sitio controlada espaciotemporalmente. La delección del gen o genes de interés (en el caso de la presente invención, c-Jun y JunB) puede inducirse mediante inyección intraperitoneal o mediante aplicación tópica de un antiestrógeno tal como tamoxifeno o OH-tamoxifeno en la piel (Vasioukhin *et al.*, 1999).

Alternativamente al sistema loxP/Cre, pueden utilizarse otros sistemas de delección de genes somáticos específicos de sitio controlados espaciotemporalmente, para generar ratones con doble inactivación específica de los queratinocitos de c-Jun y JunB.

Son ejemplos de dichos métodos alternativos para manipular los ratones con inactivación condicional de la invención, los sistemas de recombinasa específicos de sitio Flp-FRT y phiC31-att. Al igual que el sistema loxP/Cre, estos sistemas satisfacen los requisitos de presentar el gen o genes de interés flanqueados por sitios de reconocimiento para el enzima de recombinación específico de sitio y de proporcionar el enzima de recombinación mediante cruce del ratón con inactivación condicional con un ratón transgénico que expresa una recombinasa constitutivamente activa o inducible en el tejido de interés (Branda y Dymecki, 2004).

Alternativamente a los sistemas de delección de genes somáticos específicos de sitio controlados espaciotemporalmente, se han descrito las técnicas de ARNip para el silenciamiento génico específico de la piel.

Recientemente, se han creado sistemas basados en plásmidos con promotores de ARN polimerasa III que controlan moléculas de horquilla corta de ARN (ARNhc) con el fin de producir ARNip y se ha informado de la generación de líneas celulares ES con inactivaciones génicas utilizando ARNhc transgénico (Kunath *et al.*, 2003). Además, se ha establecido el transporte mediado víricamente para el silenciamiento específico de genes diana en el hígado y el cerebro de ratones mediante la expresión de ARN interferente pequeño (ARNip) (Xia *et al.*, 2002). Estos sistemas

pueden adaptarse a la generación de ratones con inactivaciones génicas o para inactivar c-Jun y JunB en los queratinocitos de ratón, por ejemplo mediante el diseño de constructos de ARNip que se expresan en los queratinocitos de los ratones tras el transporterealizado mediante protocolos de transporte génico adecuados.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a queratinocitos deficientes en c-Jun y JunB derivados de un ratón en el que los genes c-Jun y JunB han sido específicamente deletados en los queratinocitos (c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}). Los queratinocitos pueden obtenerse según métodos conocidos, por ejemplo mediante la utilización de un protocolo descrito o creado por Carroll *et al.*, 1995, Carroll y Molès, 2000, o el protocolo siguiente (descrito en la patente US nº 6.566.136):

10 secciones de piel obtenidas de ratones sacrificados que han sido rapados y lavados se separan en dermis y epidermis, por ejemplo mediante tratamiento con tripsina, por ejemplo mediante flotación de las muestras de tejido de piel en una solución de tripsina (por ejemplo aproximadamente al 0,5%) durante un tiempo suficiente para provocar la separación celular. Se separa la dermis y la epidermis y posteriormente se introduce en un medio para conseguir una suspensión. El medio para conseguir una suspensión puede contener una solución de inhibidor de tripsina de soja (SBTI) y se pone en contacto con las células durante un tiempo suficiente para inactivar la tripsina y provocar la liberación de las células. Las células se cultivan en un medio de cultivo de tejidos sin suero y se filtran con el fin de obtener los queratinocitos deseados.

20 Los queratinocitos primarios resultantes seguidamente se siembran, a una densidad celular adecuada, por ejemplo aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células/cm², sobre placas de cultivo previamente recubiertas. Las placas de cultivo habitualmente se recubren con una composición que incrementa la fijación y crecimiento de los queratinocitos, habitualmente una solución que contiene fibronectina y colágeno de tipo I.

25 Inesperadamente se encontró en los experimentos que describe la invención, que los ratones, tras la delecióninducida específicamente enqueratinocitos de c-Jun y JunB (ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}), desarrollaban una enfermedad similar a la soriasis que mostraba las características que son distintivas de la soriasis en el ser humano, menos de 2 semanas después de la inyección de tamoxifeno. Este fenotipo sólo se observó tras la deleción de tanto c-Jun como JunB, pero no se observó tras la deleción específicamenteenqueratinocitos de sólo c-Jun o sóloJunB.

30 De esta manera, la invención se refiere, en un aspecto adicional, a la utilización de ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} según se define en las reivindicaciones, como modelo animal para la soriasis y la artritis sorriática.

35 La presente invención proporciona un modelo de ratón único que recapitula muchas de las características histológicas y moleculares observadas en la piel y articulaciones de los pacientes sorriáticos. El fenotipo se desarrolla muy rápidamente con una eficiencia del 100%. La enfermedad no se caracteriza por una respuesta inflamatoria generalizada, pero es prominente en áreas de piel que no presentan pelo (orejas, patas y cola), lo que recuerda las lesiones sorriáticas de distribución simétrica en el ser humano, claramente delimitadas y contiguas a piel que no presenta síntomas. Los queratinocitos enfermos reflejan los cambios en la red de citoquinas y quimoquinasque se informa que se producen en la soriasis. El perfilado de expresión reveló evidencia adicional de que los cambios en la expresión génica eran similares a la mayoría de cambios genéticos documentados que se han descrito para la soriasis humana.

45 Los ratones ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} de la invención y los queratinocitos deficientes en c-Jun y JunB derivados a partir de los mismos resultan útiles para someter a ensayo *in vivo* fármacos contra la soriasis y la artritis sorriática.

Por ejemplo, dado el papel de las citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-8 y TNF-α, en la patogénesis de la soriasis, los ratones de la invención podrían utilizarse para evaluar inhibidores específicos de dichas rutas de las citoquinas o para someter a ensayo compuestos para sus efectos inhibidores. Una ilustración específica es la evaluación de los inhibidores de la ruta de TNF-α. Por ejemplo, los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} K5-Cre-ER se tratan con tamoxifeno para obtener ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} que desarrollan una enfermedad similar a la soriasis. Tras la primera observación de los síntomas, por ejemplo anomalías en la piel, los ratones reciben un inhibidor de dicha citoquina, por ejemplo un anticuerpo monoclonal contra el TNF-α de ratón, un inhibidor bien documentado de esta citoquina *in vivo*. A continuación, se observan los ratones para la progresión de las lesiones de la piel y el grado de progresión de la enfermedad en comparación con los animales tratados con placebo. También pueden utilizarse los nuevos inhibidores de la ruta de TNF-α, tales como receptores señuelo, inhibidores de la síntesis de TNF, inhibidoresde la MAP quinasa o ARNip terapéuticos y compararse los efectos del tratamiento con animales tratados con anti-TNF-α. De manera similar, pueden aplicarse compuestos de ensayo, por ejemplo procedentes de bibliotecas de compuestos, a los animales y evaluarse el efecto de los mismos. Puede analizarse el grado de desarrollo de las lesiones después del tratamiento, así como la constitución histopatológica de las lesiones (Croll *et al.*, 1995). Además, puede determinarse el efecto de los compuestos sobre la inducción de la enfermedad mediante el tratamiento de los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} K5-Cre-ER previamente a la administración del tamoxifeno. Pueden evaluarse los cambios de los marcadores sistémicos de inflamación, tales como los niveles de citoquinas, de proteínas de la fase aguda, de los subconjuntos de linfocitos y los niveles e isotipos de las inmunoglobulinas. También puede evaluarse el grado de inflamación antes y después del tratamiento mediante la determinación de la

permeabilidad vascular de la piel enferma utilizando marcadores de extravasación, tales como el pigmento azul de Evans o albúmina marcada con ¹²⁵I.

El modelo de ratón de la invención no se encuentra limitado a la evaluación de inhibidores de citoquinas proinflamatorias. Por ejemplo, puede someterse a ensayo en el modelo nuevos inhibidores del tráfico de los leucocitos, tales como las moléculas de adhesión o las quimoquinas, de manera similar al protocolo anteriormente indicado. Además, pueden utilizarse inhibidores específicos del sistema inmunológico, tales como los inhibidores de la activación de las células T, o de la producción o coestimulación de las citoquinas. También pueden evaluarse agentes o métodos destinados a inducir las células T reguladoras.

Finalmente, el modelo de ratón de la invención resulta útil para someter a ensayo el efecto de moduladores dirigidos específicamente contra la función de los queratinocitos u otras células de la piel. Dichos agentes pueden evaluarse tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, puede inducirse una enfermedad en ratones tal como se ha indicado anteriormente y aplicarse agentes específicos de los queratinocitos/de la piel por vía tópica o sistémica. El efecto de dichos agentes, o compuestos de ensayo, sobre el desarrollo de lesiones puede medirse mediante análisis histopatológico (Carroll *et al.*, 1995) y compararse con los ratones no tratados. De manera similar, pueden establecerse *in vitro* cultivos primarios de queratinocitos o líneas de queratinocitos a partir de los animales enfermos utilizando protocolos estándares (Carroll *et al.*, 1995). Los compuestos de ensayo pueden administrarse en las células en cultivo en diversas dosis y puede evaluarse el efecto sobre la proliferación, viabilidad, morfología y producción de citoquinas/factores de crecimiento de los queratinocitos. Además, pueden utilizarse queratinocitos con doble inactivación en cultivo, los cuales pueden obtenerse de ratones de la invención siguiendo protocolos estándares, por ejemplo tal como describen Carroll *et al.*, 1995; Carroll y Molès, 2000; Zenz *et al.*, 2003), o equivalentes *in vitro* de tejido de la piel (Szabowski *et al.*, 2000), o pueden utilizarse modelos tridimensionales de cultivo de piel (Carroll y Molès, 2000) para el cribado para fármacos que inhiban la producción de los factores de crecimiento y citoquinas derivadas de queratinocitos que son los responsables de la soriasis.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

A.) Esquema de las líneas generales de los locifloxados c-Jun y JunB y del transgénCre-ER inducible utilizado para delecionar ambos genes con la aplicación de tamoxifeno.
 B.) Esquema de tratamiento. Se inyectó 1 mg de tamoxifeno por vía intraperitoneal 5 veces en ratones adultos y se analizaron 14 días después.
 C.) Transferencia southern de c-Jun y JunB para confirmar la delección de ambos genes tras la aplicación de tamoxifeno específicamente en los queratinocitos de ratones adultos.
 D.) RPA (ensayo de protección de la ARNasa) de genes AP-1 tras la delección de c-Jun y JunB, que demuestra la regulación negativa de todos los genes AP-1 aparte de fra-2.

Figura 2

A.) Imágenes macroscópicas de orejas, pies y colas de ratones adultos tras la delección inducible de c-Jun y JunB en los queratinocitos de ratones adultos, que son similares a las observadas en la soriasis.
 B.) Histología de orejas de ratón soriático que muestra las características distintivas de la soriasis: epidermis anormalmente engrosada, paraqueratosis (queratinocitos nucleados en la capa cornificada), capa superior queratinizada engrosada (hiperqueratosis) y proyecciones epidérmicas en forma de dedos dirigidos hacia el interior de la dermis (puentes interpapilares). Se observan microabscesos epidérmicos y el típico infiltrado celular inflamatorio: células T intraepidérmicas (tinción de CD3), un número incrementado de neutrófilos en la epidermis (tinción de esterasa) y macrófagos en la dermis (tinción de esterasa y de F4/80).
 C.) Tinción H-E de dedo de ratón afectado que demuestra los infiltrados granulocíticos en la región articular similares a los observados en la artritis soriática.

En los Ejemplos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes:

Generación de ratones junB^{fl}

Se insertó un casete de selección génica de timidina quinasa y resistencia a la neomicina/floxadado y flanqueado por frt en un sitio Smal presente en la región 5' no traducida (UTR) de JunB. Se insertó el sitio loxP 3' en el sitio XhoI, 161 pb más abajo del codón de parada de traducción.

Se incluyó un gen de la toxina diftérica para la selección contra los integrantes aleatorios. El constructo de transporte linealizado se electroporó en células ES HM-1 y se llevó a cabo la identificación de los recombinantes homólogos mediante PCR utilizando dos conjuntos de cebadores tal como se ha indicado anteriormente (Schorpp-Kistner *et al.*, 1999). Se delecionaron los genes de la neomicina y de la timidina quinasa mediante transfección transitoria de un vector que expresaba la flprecombinasa. Se inyectaron dos clones celulares ES que portaban un alelo floxadado de JunB en blastocistos C57BL/6 y varias quimeras de un clon de células ES transmitieron el alelo mutante a su descendencia.

Generación de ratones c-Jun^{Δep}, JunB^{Δep*}*

Se cruzaron ratones que portaban un alelo c-jun floxado (c-Jun^{fl}, Behrenset al., 2002) con ratones que portaban un alelo JunBfloxado (JunB^{fl}, Kenneret al., 2004) con el fin de obtener ratones doblemente floxados (c-Jun^{fl}, JunB^{fl}). Los ratones doblemente floxados se cruzaron con ratones transgénicos que expresaban la fusión de recombinasaCre-receptor de estrógenos bajo el control del promotor queratina 5 específico de los queratinocitos (K5-Cre-ER, Brocardet al., 1997) con el fin de obtener ratones c-Jun^{fl}, JunB^{fl} y c-Jun^{fl}, JunB^{fl} K5-Cre-Er.

Delección inducible de c-Jun^{fl}, JunB^{fl}

Se inyectó 1 mg de tamoxifeno por vía intraperitoneal en ratones experimentales de 8 semanas de edad c-Jun^{fl}, JunB^{fl} K5-Cre-ER y en ratones de control (c-Jun^{fl}, JunB^{fl}) (Sigma, Vasioukhinet al., 1999).

Transferencia southern y ensayo de protección frente a ARNasa (RPA)

Para la transferencia southern de c-Jun, se digirieron 10 µg de ADN epidérmico con XbaI (para c-Jun), rindiendo un fragmento de 6,9 kb para el alelo c-Jun floxado y un fragmento de 3,3 kb para el alelo c-Jun deletado (Behrenset al., 2002). Para la transferencia southern de JunB, se digirieron 10 µg de ADN genómico con PstI, rindiendo un fragmento de 2,3 kb del alelo JunBfloxado y un fragmento de 0,7 kb del alelo JunBdeletado. Para la detección de las bandas, se utilizó un fragmento PstI/HindIII de 176 pb de JunB a modo de sonda (Kenneret al., 2004). Para el ensayo de protección frente a la ARNasa, se aisló ARN epidérmico total con el protocolo TRIZOL (Sigma). Se llevaron a cabo ensayos de protección frente a ARNasa utilizando los sistemas de ensayo de protección frente a ARNasamultisondaRiboQuantmJun/Fos (PharMingen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Histología

Se fijaron los tejidos durante la noche con PFA al 4% tamponado neutro a 4°C y, directamente o tras la descalcificación (hueso) en EDTA al 0,5% durante 12 días, se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros con hematoxilina y eosina (H-E) o se procesaron adicionalmente. La tinción inmunohistoquímica para anti-CD3 y F4/80 (Santa Cruz) se llevó a cabo tras eliminar el antígeno (Dako S1699) con el sistema MultiLinkDako (Dako E0453) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Ejemplo 1

Generación de ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}

Se cruzaron ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} con ratones transgénicos K5-Cre-ER y se inter cruzaron las progenies heterocigóticas para obtener ratones c-Jun^{fl}, JunB^{fl}, K5-Cre-ER y c-Jun^{fl}, JunB^{fl}. El enfoque para deletar c-Jun y JunB en la epidermis se indica de manera general en la fig. 1A y 1B. En breve, se inyectó 1 mg de tamoxifeno por vía intraperitoneal 5 veces en ratones experimentales de 8 semanas de edad (c-Jun^{fl}, JunB^{fl}, K5-Cre-ER) y en ratones de control (c-Jun^{fl}, JunB^{fl}). Dos semanas después de la última inyección, se analizaron los ratones. Se analizó la delección de c-Jun y JunB mediante transferencia southern y RPA (ensayo de protección frente a ARNasa). Los análisis de transferencia southern para la delección de c-Jun y JunB (fig. 1C) demostraron la delección en ambos casos. La señal remanente para c-Jun floxado y JunBfloxado se explica por la delección incompleta y el infiltrado inflamatorio observado en los queratinocitos de los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} (fig. B). La cuantificación del ARNm de AP-1 en los queratinocitos de los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*} mostró una regulación negativa significativa del ARNm de c-Jun y JunB y también de otros genes de AP-1 excepto fra2.

Ejemplo 2

Caracterización de los ratones c-Jun^{Δep*}, JunB^{Δep*}

Los ratones obtenidos siguiendo el tratamiento descrito en el Ejemplo 1 desarrollaron un fenotipo similar a la soriasis en menos de 2 semanas. La piel que no presentaba pelo, tal como la de orejas, cola y pies resultó drásticamente afectada (fig. 2A). El examen histológico (fig. 2B) reveló epidermis anormalmente engrosada, paraqueratosis (queratinocitos nucleados en la capa cornificada), capa superior queratinizada engrosada (hiperqueratosis) y proyecciones epidérmicas en forma de dedos dirigidos hacia el interior de la dermis (puentes interpapilares). Además, se observaron microabscesos epidérmicos y el típico infiltrado de células inflamatorias: células T intraepidérmicas (tinción de CD3), número incrementado de neutrófilos en la epidermis (tinción de esterasa) y macrófagos en la dermis (tinción de esterasa y de F4/80). La tinción de H-E de un dedo de ratón afectado muestra infiltrados granulocíticos en la región articular que son similares a los observados en la artritis sorriática (fig. 2C).

Referencias

Baichwal V.R. and Tjian R. (1990). Control of c-Junactivity by interaction of a cell-specific inhibitor withregulatory domain d: Differences between v- and c-Jun. Cell 63, 815-25.

- Behrens A., Sibilila M., David JP., Mohle-Steinlein U., Tronche F., Schutz G., Wagner EF. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* 21, 1782-90.
- 5 Bohmann D. and Tjian R. (1989). Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: Differential activity of c- and v-Jun. *Cell* 59, 709-17.
- Boyle W.J., Smeal T., Defize L.H.K., Angel P., Woodgett J.R., Karin M., and Hunter T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573-584.
- 10 Branda C.S. and Dymecki S.M. (2004). Talking about a Revolution. The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in Mice. *Dev. Cell* 6(1):7-28.
- 15 Brocard J., Warot X., Wendling O., Messaddeq N., Vonesch J.L., Chambon P., Metzger D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14559-63.
- Carroll JM., Luetke NC., Lee DC., Watt FM. (1995). *Suprabasal* integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83:957-968.
- 20 Carroll JM, Molès JP. (2000) A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes. *Exp Dermatol* 2000: 9: 20-24.
- Chiu R., Angel P., Karin M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* 59, 979-86.
- 25 Danielian PS., White R., Hoare SA., Fawell SE., Parker MG. (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 7(2):232-40.
- Deng T., Karin M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* 7(3):479-90.
- 30 Du W., Thanos D., and Maniatis T. (1993). Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74, 887-98.
- 35 Eferl R. and Wagner, E.F. (2003). AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 859-868.
- Herrlich P. and Ponta H. (1989). "Nuclear" oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *Trends Genet.* 5:112-5.
- 40 Imler J.L., Ugarte E., Wasyluk C. and Wasyluk B. (1988) v-jun is a transcriptional activator, but not in all cell lines. *Nucleic Acids Res.* 16, 3005-12.
- Hilberg F., Agguzi A., Howells N., and Wagner E.F. (1993). c-Jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.
- 45 Jiang CK., Epstein HS., Tomic M., Freedberg IM. and Blumenberg M. (1991). Functional comparison of the upstream regulatory DNA sequences of four human epidermal keratin genes. *J. Invest. Dermatol.*, Vol 96, 162-167.
- 50 Johnson R.S., van Lingen B., Papaioannou V.E., and Spiegelman B.M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* 7, 1309-1317.
- Karin M. and Smeal T. (1992). Control of transcription factors by signaling transduction pathways: The beginning of the end. *Trends Biochem. Sci.* 17, 418-22.
- 55 Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF. (2004): Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol.* 164(4):613-23.
- 60 Kunath T., Gish G., Lickert H., Jones N., Pawson T., Rossant J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.* 21 (5): 559-61
- Lebwohl M (2003). Psoriasis. *Lancet* 361(9364):1197-204
- 65 Li B., Tournier C., Davis R.J., Flavell R.A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* 18(2):420-32.

- Li G., Gustafson-Brown C., Hanks SK., Nason K., Arbeit JM., Pogliano K., Wisdom RM., Johnson RS. (2003). c-jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev. Cell* 4(6): 865-77.
- 5 Lin A., Frost J., Deng T., Smeal T., al-Alawi N., Kikkawa U., Hunter T., Brenner D., and Karin M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 70, 777-89.
- Minamino T, Gaussen V, DeMayo FJ, Schneider MD (2001). Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein. *Circ Res*. Mar 30;88(6): 587-92
- 10 Nickoloff BJ., von den Driesch P., Raychaudhuri SP., Boehncke W-H., Morhenn VB., Farber EM., Holik MF., Schröder JM. (2000). Is psoriasis a T-cell disease? *Exp Dermatol* 9: 359-375.
- Pulverer B.J., Kyriakis J.M., Avruch K., Nikolakaki E., and Woodgett J.R. (1991). Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- 15 Ransone L.J. and Verma I.M. (1990). Nuclear protooncogenes Fos and Jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 539-57.
- Sachsenmaier C. and Radler-Pohl A. (1994). Regulation of c-Jun activity by phosphorylation. In: The fos and jun families of transcription factor/ edited by Peter E. Angel and Peter A. Herrlich. CRC Press. pp. 61-70.
- 20 Schön MP (1999). Animal models of psoriasis - what can we learn from them? *J Invest Dermatol.* 112(4):405-10
- Schorpp-Kistner M., Wang ZQ., Angel P., Wagner EF. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* 18(4):934-48.
- 25 Stein B., Baldwin A.S. Jr., Ballard D., Greene A, Angel P. and Herrlich P. (1993). Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological functions. *EMBO J.* 12, 3879-91.
- 30 Szabowski A., Mass-Szabowski N., Andrecht S., Kolbus A., Schorpp-Kistner M., Fusenig NE., Angel P. (2000). c-Jun and junB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103(5):745-55
- Vasioukhin V., Degenstein L. Wise B., Fuchs E. (1999). The magic touch: Genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8551-8556.
- 35 Xia H., Mao Q., Paulson H.L., Davidson B.L. (2002) siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 20(10): 1006-10.
- Xia YP., Li B., Hylton D., Detmar M., Yancopoulos GD., Rudge JS. (2003) Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 102(1):161-8.
- 40 Zenz R., Scheuch H., Martin P., Frank C., Eferl R., Kenner L., Sibilio M., Wagner EF. (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell* 4(6): 879-89.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ratón deficiente en *c-Jun* y *JunB* en los queratinocitos debido a la delección de los genes *c-Jun* y *JunB* en los queratinocitos.
2. Ratón según la reivindicación 1, en el que la delección de los genes *c-Jun* y *JunB* se ha inducido mediante la expresión de un enzima de recombinación inducible en los queratinocitos.
- 10 3. Ratón según la reivindicación 1 ó 2, en el que la delección de los genes *c-Jun* y *JunB* en los queratinocitos está mediada por un enzima de recombinación (recombinasa) específico de sitio inducible cuya síntesis se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor específico de los queratinocitos, y que actúa sobre sitios de reconocimiento específicos flanqueantes de los genes *c-Jun* y *JunB* en el genoma.
- 15 4. Método de obtención del ratón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un ratón transgénico que presenta los genes *c-Jun* y *JunB* flanqueados por sitios de reconocimiento para un enzima de recombinación específico de sitio inducible se cruza con un ratón transgénico que expresa dicho enzima de recombinación inducible bajo el control transcripcional de un promotor específico de los queratinocitos y en el que la actividad de recombinación de dicho enzima de recombinación se induce posteriormente, resultando en la delección de dichos genes en los queratinocitos.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que el enzima de recombinación inducible es la recombinasa Cre fusionada con el receptor de estrógenos, y en el que la expresión de dicho enzima de recombinación inducible se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor específico de los queratinocitos.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, en el que los sitios de reconocimiento son sitios loxP y el enzima recombinasa es la recombinasa Cre, que se encuentra fusionada con el receptor de estrógenos, bajo el control de un promotor específico de los queratinocitos, y en el que la delección específica de los queratinocitos de los genes *c-Jun* y *JunB* se induce mediante la aplicación de un antiestrógeno.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, en el que el antiestrógeno se aplica mediante inyección intraperitoneal o la aplicación tópica.
- 35 8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que el antiestrógeno es el tamoxifeno.
9. Queratinocitos deficientes en *c-Jun* y *JunB* debido a la delección de los genes *c-Jun* y *JunB*, derivados a partir del ratón según las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 10. Ratón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como modelo animal para la soriasis y la artritis soriática en el ser humano.--

Figura 1A

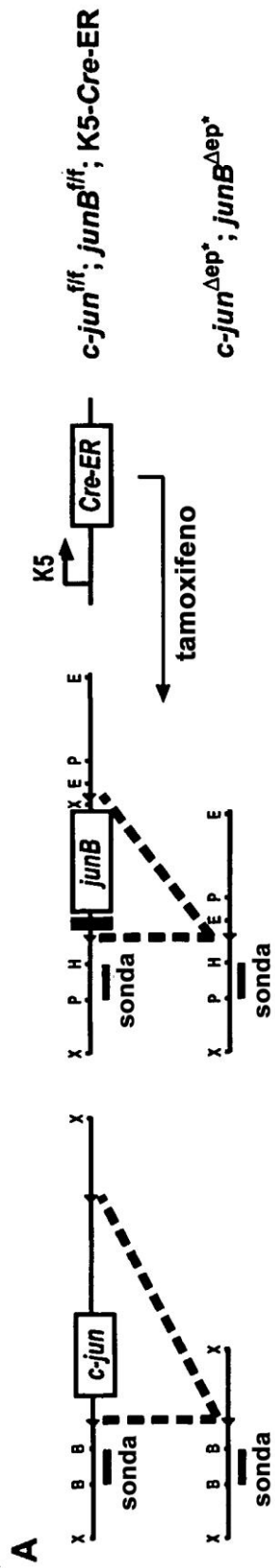


Figura 1B

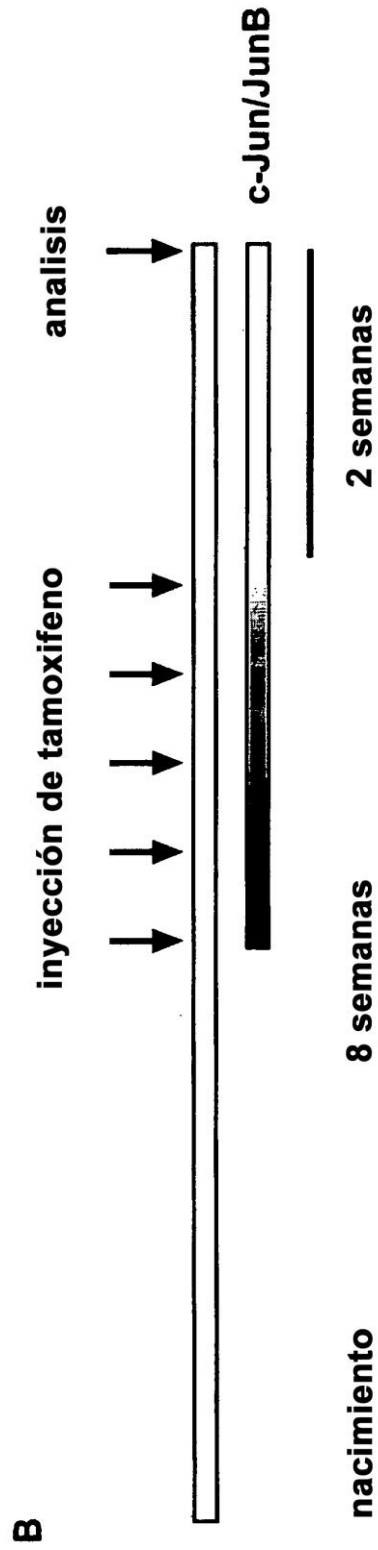


Figura 1C

C

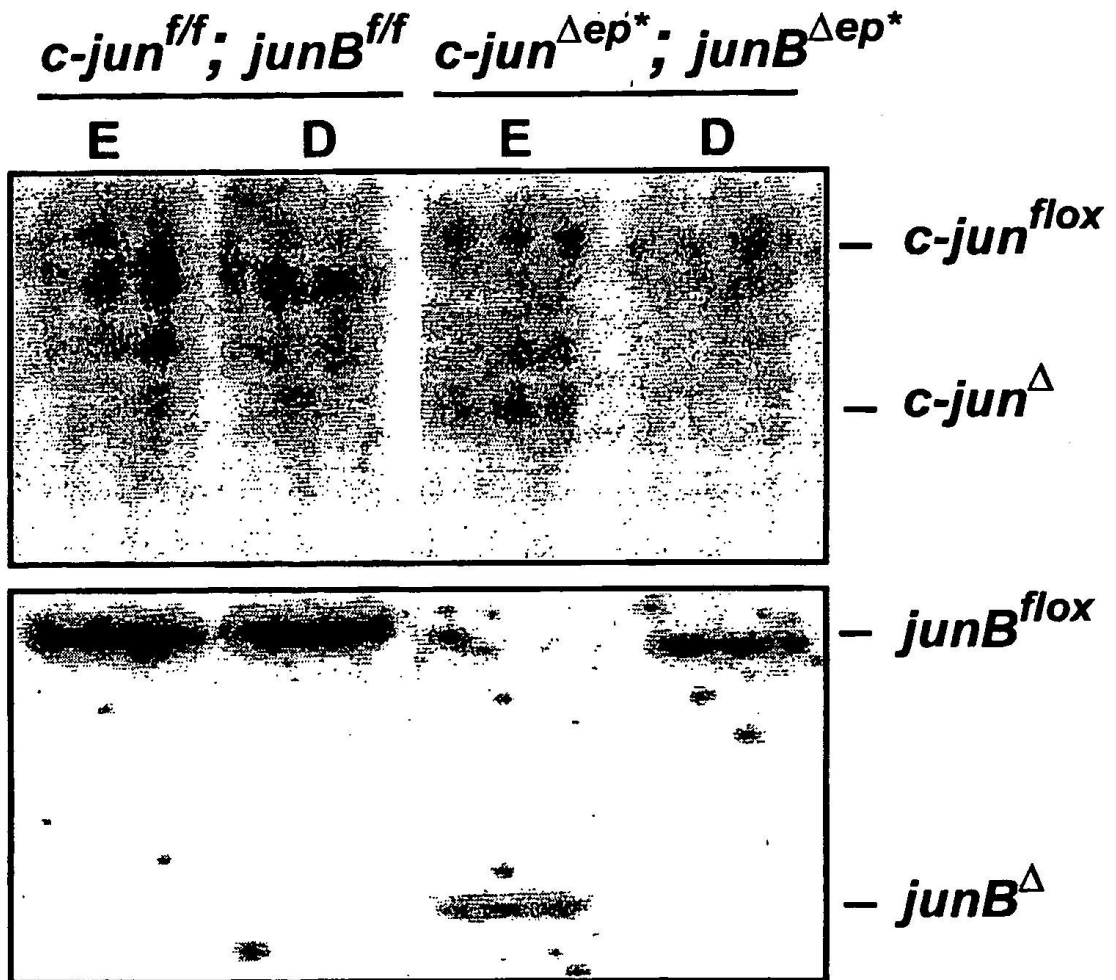


Figura 1D

D

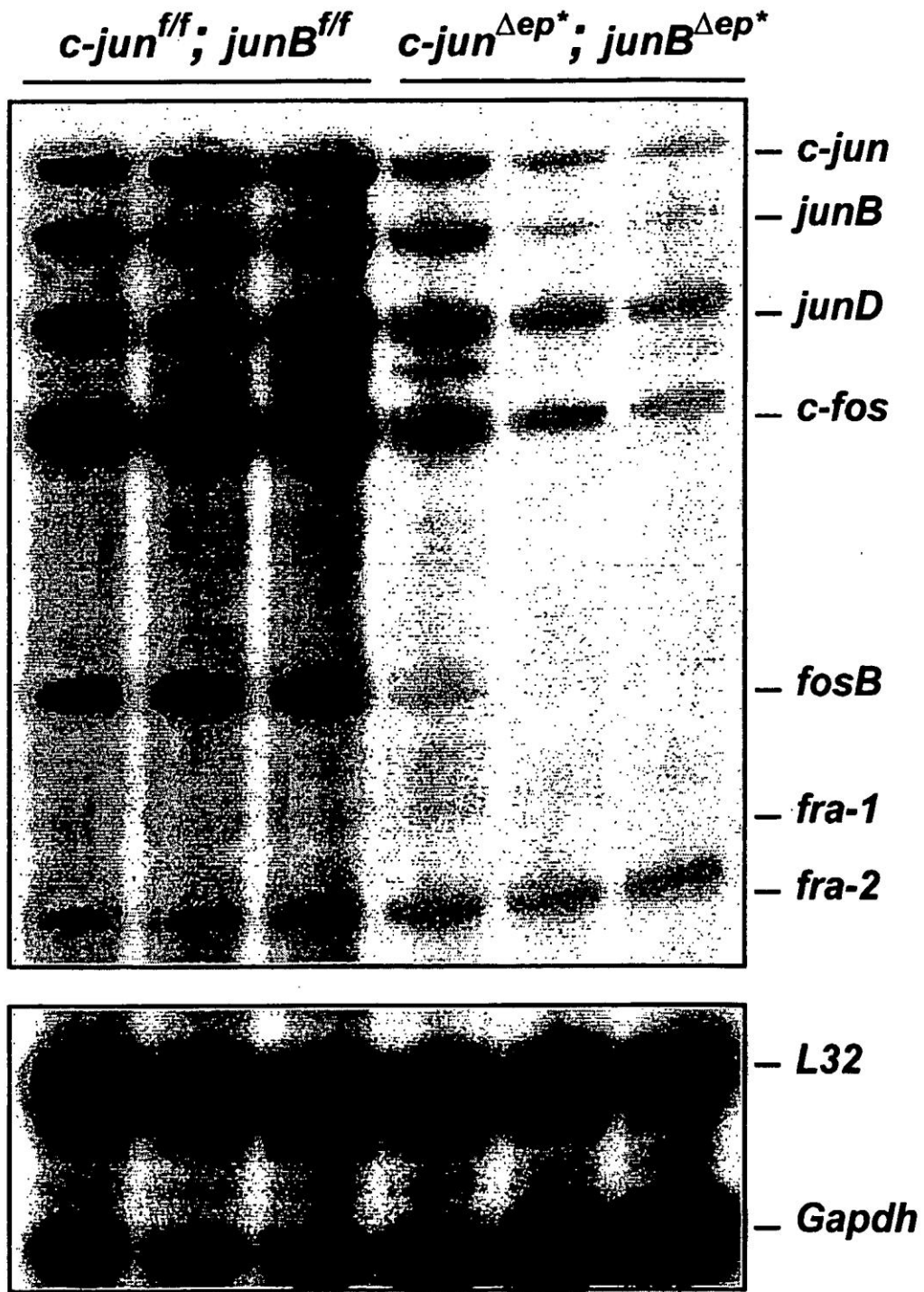


Figura 2A

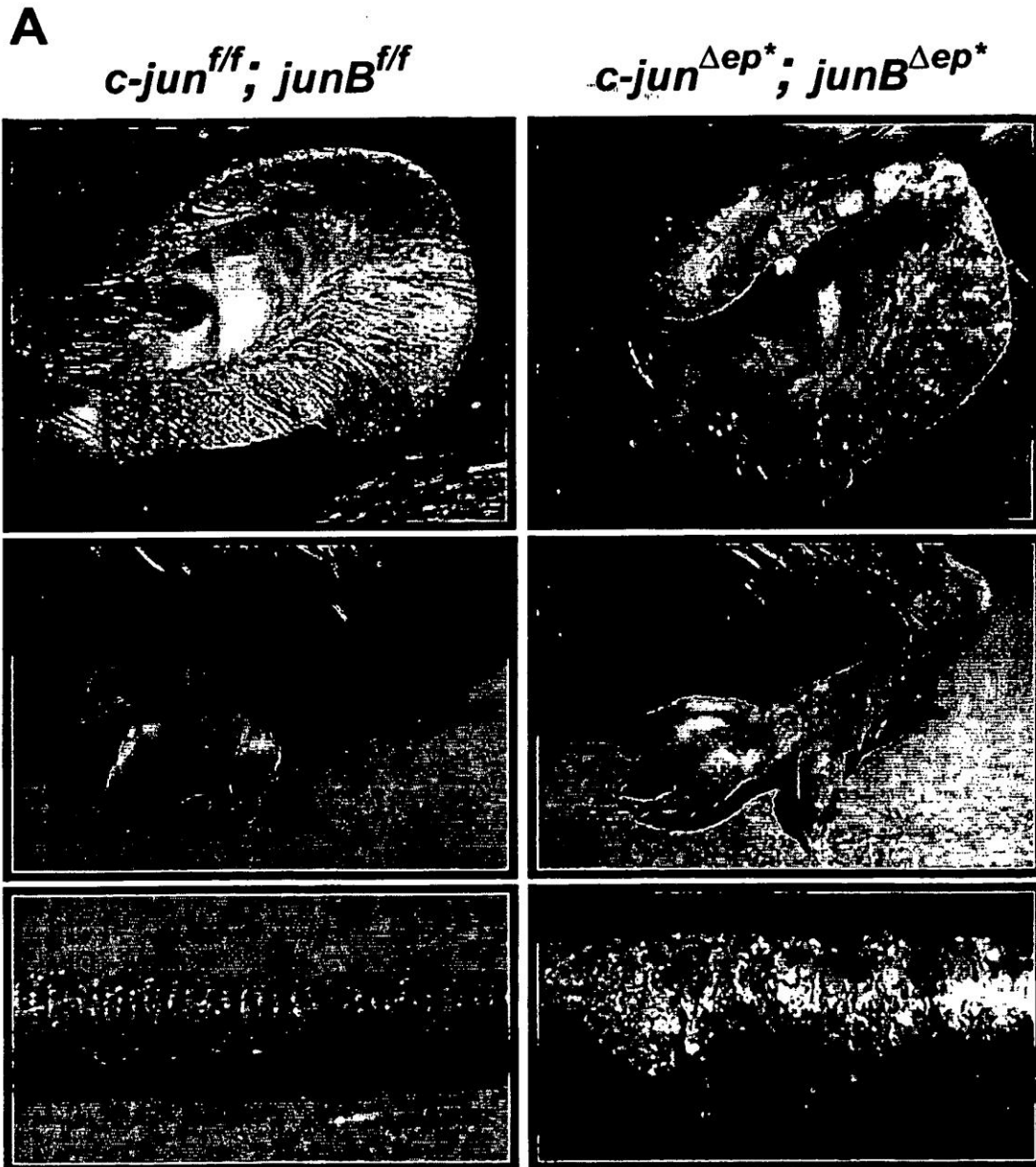


Figura 2B

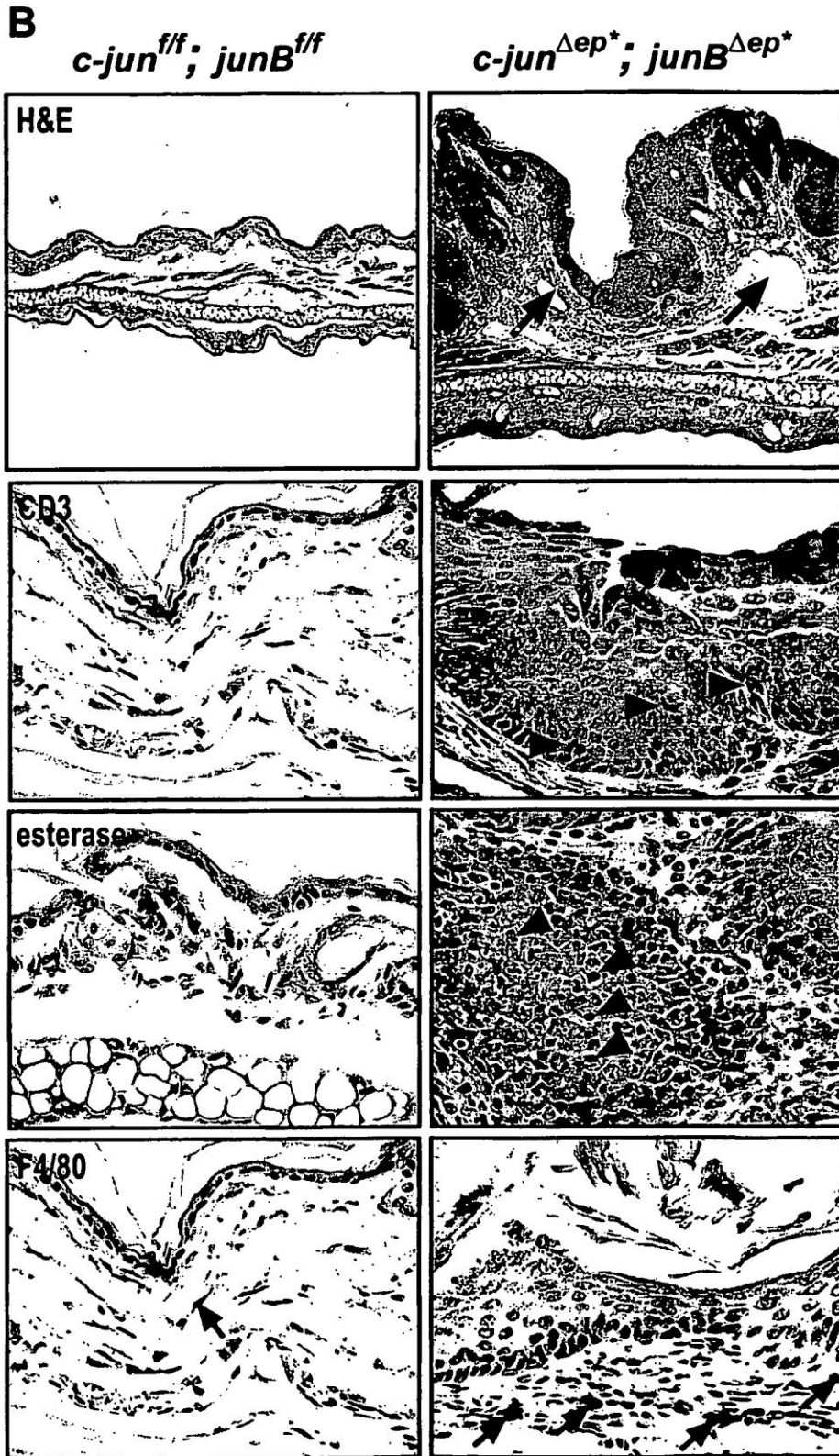
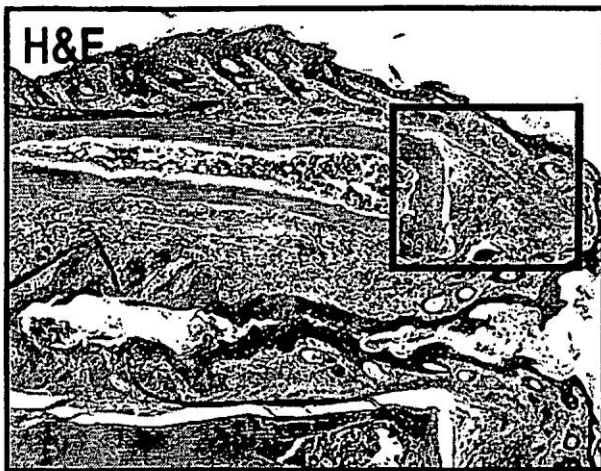


Figura 2C

C

c-jun^{Δep*}; *junB*^{Δep*}



dedo



articulación