

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 616**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/IB2012/000882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12738593 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2696860**

54 Título: **Modelo animal no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones**

30 Prioridad:

13.04.2011 EP 11162272

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**OGIER-DENIS, ERIC;
TRETON, XAVIER;
DANIEL, FANNY;
GUICHARD, CÉCILE;
PEDRUZZI, ERIC;
BOUHNİK, YORAM y
HARNOY, YANN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 607 616 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelo animal no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un modelo animal no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal.

10 **Estado de la técnica**

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino (EII) intermitente, crónica y recidivante del colon, caracterizada por lesiones de la mucosa superficial que se extienden hasta el recto y progresan hacia arriba. Los antecedentes naturales de la CU se caracterizan por la progresión de lesiones en el colon en hasta un 50 % de los sujetos. Esto sugiere que la mucosa del colon tiene una susceptibilidad "global" a los factores medioambientales, pero la etiología de la CU sigue siendo desconocida, y los tratamientos actuales son limitados, ya que el 30 % de los pacientes requiere una colectomía. Los estudios en seres humanos identificaron un estrés en el retículo endoplásmico (ERS) desequilibrado en los pacientes con CU con la mucosa del colon no afectada ¹². Los modelos animales en los que el ERS está alterado son muy sensibles a la colitis inducida químicamente ²⁻⁶ o desarrollan una inflamación intestinal ²⁷⁻⁹, lo que sugiere que el ERS desequilibrado da lugar a una inflamación. Sin embargo, no hay ninguna estrategia propuesta para la regulación del ERS en la gestión de la CU, en parte por la ausencia de un modelo experimental adecuado que simule la CU.

25 Kuwano et al. (Free Radical Biology and Medicine, volumen 45, publicación 12, 15 de diciembre de 2008, páginas 1642-1652) divulgan que el factor de necrosis tumoral α activa la transcripción del gen organizador de la oxidasa de NADPH 1 (NOXO1) y regula por aumento la producción de superóxido en las células epiteliales del colon.

Objeto de la invención

30 La presente invención se refiere a un modelo animal transgénico no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal, que comprende una alteración dirigida en los genes de la IL10 y de la NOX1, de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, y en el que se ha llevado a cabo una apendicectomía o una extirpación del suelo cecal en el animal.

35 **Descripción detallada de la invención**

Los presentes inventores han generado un modelo animal transgénico no humano de colitis ulcerosa. Han averiguado que un animal con la IL10 y la NOX1 inactivadas da como resultado un animal no humano que desarrolla de forma natural un fenotipo convincente de colitis ulcerosa y de sus complicaciones, tales como un fenotipo de colangitis esclerosante primaria y de cáncer colorrectal. Dichos animales permiten el cribado y la evaluación de compuestos y de otros regímenes terapéuticos *in vivo* como posibles tratamientos o prevenciones para la colitis ulcerosa, la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal.

45 Consecuentemente, la presente invención se refiere a un modelo animal transgénico no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal, que comprende una alteración dirigida en los genes de la IL10 y de la NOX1, de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, y en el que se ha llevado a cabo una apendicectomía o una extirpación del suelo cecal en el animal.

50 Según se usa en el presente documento, el término "gen de la IL10" tiene su significado general en la materia y se refiere al gen que codifica para la interleucina 10 (IL10)

Según se usa en el presente documento, el término "gen de la NOX1" tiene su significado general en la materia y se refiere al gen que codifica para la oxidasa de NADPH 1 (Nox1).

55 El término "transgen", según se usa en el presente documento, pretende indicar un vector de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que han sido manipuladas *in vitro* y posteriormente introducidas en el genoma de una especie, de forma que se mantienen de forma estable y heredable en ese genoma. Un "animal transgénico" es un animal que contiene dicho transgen en sus células.

60 Normalmente, el animal es un animal con el gen de la IL10 y con el gen de la NOX1 inactivados. Un animal "inactivado" es una subfamilia de transgénicos, y es un animal en el que el constructo transgénico ha provocado que un gen endógeno no sea expresado.

65 El animal transgénico no humano de la invención puede ser cualquier animal que inicialmente comprenda un gen endógeno de la NOX1 y de la IL10. Por endógeno se entiende que el gen está comprendido en el genoma de ese

animal, y en unas circunstancias normales, sería expresado para producir la correspondiente proteína.

Preferentemente, el animal es un mamífero. Más preferentemente es un roedor, y particularmente se prefiere cuando el animal transgénico es un ratón o una rata.

5 El modelo animal no humano podría ser obtenido mediante el cruce de un animal inactivado para la IL10 con un animal inactivado para la NOX1.

10 La alteración dirigida puede ser en cualquier parte de los genes, sujeta únicamente al requisito de que inhiba la expresión de las proteínas funcionales. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inhibición de la expresión de la proteína completamente, o causando la expresión de una proteína truncada o de una proteína que está mutada, de forma que no puede llevar a cabo su función, por ejemplo, mediante el diseño de mutaciones de aminoácidos en el sitio activo. Normalmente, la alteración dirigida es tal que se traduce en una proteína truncada no funcional mediante el uso de una inserción en un codón de detención de un exón. La alteración dirigida del locus del gen está causada por la integración en el genoma del constructo transgénico. Normalmente, la interacción se consigue mediante una recombinación homóloga.

20 Los animales transgénicos no humanos de la invención pueden ser producidos mediante métodos bien conocidos en la materia. Existen varias técnicas que permiten la introducción de material genético, tal como un transgen, en la línea germinal. El protocolo usado más habitualmente y preferido comprende la inyección directa del transgen en el pronúcleo masculino del óvulo fertilizado, dando como resultado la integración aleatoria en un locus de un número variable de copias, habitualmente en un conjunto de cabeza a cola. Los óvulos inyectados son transferidos después de nuevo al útero de las madres receptoras pseudopreñadas. Parte de la descendencia resultante puede tener una o varias copias del transgen integradas en sus genomas, habitualmente en un sitio de integración. Estos animales "fundadores" son cruzados después para establecer líneas transgénicas y para retrocruzarlos con los antecesores genéticos de elección. Es preferible tener la inserción del transgen en ambos cromosomas (homocigosis), ya que esto evita la necesidad de genotipados repetidos en el transcurso de la crianza rutinaria de ratones.

30 Alternativamente, para la producción de los ratones transgénicos, los transgenes pueden ser introducidos a través de células madre embrionarias (ES), mediante el uso de una electroporación, de vectores retrovíricos o de una lipofección para la transferencia génica. Esto está seguido por la inserción aleatoria en el genoma de las células madre embrionarias pluripotentes (ES), seguido de la producción de ratones quiméricos y la posterior transmisión de la línea germinal. Se han usado transgenes de hasta varios cientos de kilobases de ADN de roedor para producir ratones transgénicos de esta forma.

35 Posteriormente puede asegurarse de que en los animales transgénicos se ha efectuado el cambio genotípico requerido, de cualquier forma adecuada. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la detección de la presencia del transgen mediante una PCR con cebadores específicos, o mediante una inmunotransferencia Southern de ADN de cola con una sonda específica. La prueba de la recombinación homóloga que da lugar a la inserción del transgen se lleva a cabo mediante una digestión de restricción. Los tamaños de las bandas observados si se ha producido la recombinación son diferentes a los observados si no se ha producido. Algunos métodos adecuados para este procedimiento se proporcionan en los ejemplos. La prueba de homocigosis en la inserción del transgen puede llevarse a cabo mediante el uso de una inmunotransferencia Southern cuantitativa para la detección de una diferencia doble en la fuerza de la señal entre los animales transgénicos heterocigotos y homocigotos. La confirmación de que el gen no está siendo expresado puede llevarse a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas.

50 Una vez confirmado el genotipo deseado, la línea del animal transgénico puede someterse a varias pruebas para la determinación del fenotipo, según se ha descrito en el Ejemplo. Las pruebas implicadas en esta caracterización fenotípica dependen de qué cambio genotípico se haya efectuado, y pueden incluir, por ejemplo, estudios morfológicos, bioquímicos y de comportamiento.

55 El desarrollo de un cáncer colorrectal puede estar desencadenado por la realización de una apendicectomía (o de una extirpación del suelo cecal) en el animal transgénico no humano. Se ha demostrado que una apendicectomía (o una extirpación del suelo cecal) llevada a cabo en un ratón con el gen de la IL10 y el gen de la NOX1 inactivados permite el desarrollo reproducible de un cáncer colorrectal espontáneo a la edad de 4-5 semanas.

60 El modelo animal transgénico no humano que comprende una alteración dirigida en los genes de la interleucina 10 (IL10) y de la oxidasa de NADPH 1 (NOX1), de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, puede usarse para cribar fármacos que reviertan el fenotipo mostrado, y que por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o en la prevención de la colitis ulcerosa y de sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal.

65 Consecuentemente, un objeto adicional de la presente invención se refiere a un método no terapéutico para el cribado de un compuesto candidato para su uso como fármaco para el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa, y/o de sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria o el cáncer

colorrectal, que comprende i) la administración del compuesto candidato a un modelo de animal transgénico no humano que comprende una alteración dirigida en los genes de la interleucina 10 (IL10) y de la oxidasa de NADPH 1 (NOX1), de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, ii) la caracterización del fenotipo del modelo animal no humano después de la administración del compuesto candidato, y iii) la selección positiva del compuesto candidato que revierte o que retrasa el fenotipo de colitis ulcerosa en el modelo animal no humano.

El método de la invención es por lo tanto particularmente adecuado para la identificación de fármacos para el tratamiento de la colitis ulcerosa y/o para la identificación de fármacos para el tratamiento y la prevención de las principales complicaciones de la colitis ulcerosa, tales como la colangitis esclerosante primaria o el cáncer colorrectal.

El efecto del compuesto candidato sobre el modelo de animal transgénico no humano puede ser evaluado mediante la determinación de si el compuesto candidato causa una reversión o una mejora de cualquier tipo en los cambios celulares o fisiológicos causados por la enfermedad (por ejemplo, colitis, diarrea, elevada incidencia de sangrado rectal, cambio en el peso del cuerpo y del colon, y prolapsos). Normalmente, los compuestos candidatos pueden probarse mediante el uso de los ensayos y de las pruebas según se describen en el Ejemplo.

Los compuestos candidatos adecuados que pueden probarse en los métodos anteriores incluyen productos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos y anticuerpos injertados con una CDR). Adicionalmente, también pueden ensayarse colecciones combinatorias, entidades químicas definidas, pequeñas moléculas, péptidos y miméticos de péptidos, oligonucleótidos y colecciones de productos naturales, tales como colecciones de expresión (por ejemplo, colecciones de expresión en fago).

En una realización en particular, el compuesto candidato ha sido previamente caracterizado como un inhibidor de la PP1R15A/GADD34 que restaura la fosforilación del eIF2 α .

Los compuestos candidatos seleccionados positivamente en los métodos de cribado de la invención pueden usarse para la prevención o el tratamiento de la colitis ulcerosa, de la colangitis esclerosante primaria y del cáncer colorrectal. Consecuentemente, el estado de un paciente que padece dicha enfermedad puede mejorarse por lo tanto mediante la administración de dicho producto. La formulación del producto para su uso en la prevención o en el tratamiento de la enfermedad dependerá de factores tales como la naturaleza del agente identificado, la combinación precisa de síntomas y la gravedad de la enfermedad. Normalmente el agente se formula para su uso con un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede formularse para una administración intracraneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica u oral. El profesional médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria para cada paciente en particular. El portador o el diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. La dosis del producto puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente según la sustancia usada; la edad, el peso y el estado del paciente que se va a tratar; la vía de administración; y la gravedad de la enfermedad y el régimen requerido. Sin embargo, una dosis adecuada puede ser de entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal, tal como de entre 1 y 40 mg/kg de peso corporal. De nuevo, el profesional médico será capaz de determinar la vía de administración y la dosis necesarias para cualquier paciente en particular.

La presente invención también proporciona un kit para el cribado de un compuesto candidato para su uso como fármaco para el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa, de la colangitis esclerosante primaria y del cáncer colorrectal, kit que comprende un modelo animal no humano de la invención, y medios para la determinación de si el compuesto candidato puede mejorar el fenotipo del modelo animal no humano.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben ser interpretados en modo alguno como limitantes del ámbito de la presente invención.

EJEMPLO:

La colitis ulcerosa (CU) se caracteriza por una implicación exclusiva del colon, con lesiones en la superficie de la mucosa asociadas con un agotamiento en las células caliciformes y una disminución en la secreción de mucinas en la mucosa inflamatoria del colon ¹¹. Aunque se ha propuesto que el epitelio de los pacientes con CU es difusamente anormal independientemente de la inflamación ¹², las alteraciones tempranas que antedatan la inflamación de las células epiteliales del colon siguen siendo insuficientes. Ahora es evidente que el deterioro en la adecuada resolución del ERS por la respuesta de una proteína no plegada alterada (UPR) en las células epiteliales puede dar lugar a, o sensibilizar frente a, una inflamación del colon tanto en estudios con animales ²⁻⁸ como con seres humanos ¹². Sin embargo, las consecuencias de las alteraciones del ERS durante la CU siguen siendo incomprendidas. La UPR es un proceso cuidadosamente orquestado que implica tres sensores proximales, PERK, ATF6 e IRE1, que permiten que las células soporten una gran diversidad de condiciones estresantes. La acción combinada de estos sensores restaura la homeostasis celular mediante el cese de la traducción de proteínas, el aumento en la producción de chaperonas y la degradación de la carga de proteínas aberrantes. Un ERS prolongado o anormal afecta negativamente a la función celular normal, dando lugar a una inflamación y/o a una apoptosis ^{13,14}.

La relación entre las células caliciformes, el ERS y la inflamación no está clara, aunque las células caliciformes y la barrera mucosa se han relacionado con la inflamación. Sin embargo, la inactivación del gen de la mucina *Muc2* en ratones no es suficiente para provocar una colitis, dado que parece que la inflamación sólo aparece con un trasfondo genético permisivo^{15,16} y los pacientes con una CU expresan el MCU2. Adicionalmente, un agotamiento parcial o total en el número de células caliciformes¹⁷⁻²⁰, y por lo tanto en el mucus y en los productos antibacterianos, es insuficiente para inducir una colitis. Finalmente, la acumulación de una proteína mutada sin sentido *Muc2*^{ref7} o HLA-27⁹ que tiende a un mal plegamiento en el ER, o la inactivación de la isomerasa de disulfuro de la proteína *Agr2*^{ref5} induce un ERS exagerado en las células secretoras y la subsiguiente inflamación. Por lo tanto, la predisposición a la colitis podría residir en las propias células caliciformes y en su incapacidad para gestionar el ERS en ausencia de una disfunción inmunitaria, y en el marco de una flora colónica normal.

Para explorar la desconcertante forma mediante la cual las células caliciformes se ven afectadas por el ERS en la CU, aumentamos artificialmente el número de células caliciformes en unas condiciones de ERS. Cruzamos ratones deficientes en *Nox1*, que muestran una desregulación fina de las células progenitoras del colon, que da lugar a un aumento en la expresión de las células caliciformes¹⁰, con ratones *IL-10*^{KO}, que expresan un ERS desregulado en las células epiteliales intestinales⁸ y desarrollan una enterocolitis que depende tanto del trasfondo genético como de los factores medioambientales²¹. La relevancia de este modelo de *IL-10/Nox1*^{dKO} se basa en la expresión, por parte de las células epiteliales de colon humano, tanto de la *IL-10*²² como de la *NOX1*^{23 24}. De forma interesante, la expresión de la *NOX1* sigue siempre el mismo gradiente colónico que las células caliciformes²⁵ y que las lesiones de la CU. Además, un estudio de asociación pangenómico muestra una asociación significativa entre la *GTPasa Rad*^{ref26} pequeña (una compañera de la *NOX1*^{ref 27}) y los genes de la *IL-10*²⁸ con la CU. Aquí, demostramos que los niveles de expresión de la *IL-10* y de la *NOX1* estaban notablemente alterados en la mucosa colónica no inflamada de los pacientes con CU (n = 12) con respecto a los controles sanos (n = 12).

Todos los ratones C57B1/6-*IL10/Nox1*^{dKO} criados con SPF desarrollaron espontáneamente una colitis a las 6/7 semanas, y unas puntuaciones del índice de actividad patológica (DAI) que se hicieron cada vez más graves con la edad, incluyendo diarrea, elevada incidencia de sangrado rectal, cambios en el peso del cuerpo y del colon, y prolapsos. Ninguno de los ratones WT y con una única inactivación desarrollaron colitis durante el marco temporal estudiado. Las puntuaciones histopatológicas revelaron que los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} desarrollaron una colitis más grave a lo largo del eje proximal-distal y mostraban signos de CU sin ningún signo de ileítis, incluyendo infiltrados polimorfonucleares, abscesos en la cripta, edema, erosión epitelial focal y pérdida de la cripta. A continuación medimos la permeabilidad del FITC-dextrano en segmentos del colon distal, y se identificó una translocación bacteriana autóctona en el bazo de ratones de 7 y 12 semanas de edad. Coherentemente con el estado de colitis, únicamente los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} mostraron un aumento en la permeabilidad del colon y mostraron una esplenomegalia que está estrechamente relacionada con un aumento en la translocación de las bacterias comensales gramnegativas. De forma interesante, los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} mostraron las principales complicaciones de la CU, tales como un cáncer colorrectal asociado a una colitis, y una colangitis esclerosante primaria espontánea a los 7/8 meses de edad. Por el contrario, los ratones *IL10*^{KO} mostraron una enterocolitis leve con una baja frecuencia (< 20 % a las 34 semanas), sin mostrar ningún signo de colangitis ni de cáncer colorrectal (a > 8 meses de edad; este estudio y²⁹). De forma interesante, aquí notificamos el exhaustivo cribado pangenómico de 561 microARN de la mucosa epitelial del colon de ratones *Nox1*^{KO}, *IL10*^{ko} e *IL10/Nox1*^{dKO} (de 6 y de 16 semanas de edad) con respecto a ratones WT. Coherentemente con los hallazgos previos en los pacientes con CU^{30,31}, los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} expresan prácticamente un 50 % de los microARN relevantes que definen la CU característica.

Para analizar las respuestas de las citocinas en el sitio de inflamación, se recogieron muestras de colon y se analizaron varias citocinas tanto a nivel del ARNm como de las proteínas. Los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} mostraron un aumento en los niveles de expresión de las citocinas proinflamatorias fundamentalmente implicadas en la CU. El análisis de la población de células linfoides y mieloides del bazo no difería entre los cuatro genotipos. Por el contrario, se observó una infiltración masiva de linfocitos T_{reg} FoxP3⁺ únicamente en el tejido de colon, a pesar de la inflamación de la mucosa activa, y en menor grado en el bazo de los ratones *IL10/Nox1*^{dKO}, de forma coherente con los hallazgos de la CU³². Para determinar si el genotipo de las estirpes hematopoyéticas afectaba a la magnitud de la colitis, generamos ratones quiméricos de médula ósea (BM) en los que los receptores y los donantes eran ratones WT (CD45.1) y WT, *IL10*^{KO} y *IL10/Nox1*^{dKO} (CD45.2), respectivamente. De forma interesante, la reconstitución de los ratones WT irradiados con BM de *IL10*^{KO} o de *IL10/Nox1*^{dKO} fue insuficiente para causar la enfermedad, lo que demuestra que la colitis es mayoritariamente inherente a las células epiteliales más que a las estirpes hematopoyéticas en los ratones *IL10/Nox1*^{dKO}.

El epitelio del colon de los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} mostraba una escasez de mucinas positivas en Alcian Blue/PAS asociada con una pérdida de las células caliciformes en los sitios ulcerados. Consecuentemente, los niveles de expresión de las proteínas *Muc2* y *Muc4* eran drásticamente bajos en las áreas del colon inflamadas de los ratones *IL10/Nox1*^{dKO}. El enrarecimiento y la morfología aberrante de las células caliciformes, con pocas tecas e inmaduras asociadas con una pequeña cantidad de mucus, y unas mitocondrias redondas e hinchadas, se observaban de forma similar en el colon tanto de los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} como de los pacientes con CU.

Las secciones colónicas de los ratones *IL10/Nox1*^{dKO} mostraron un aumento en el número de células positivas para PCNA y fosfohistona 3, lo que sugiere un aumento en la proliferación epitelial. Una microscopía electrónica de

barrido (SEM) mostró un aumento del ~ 30 % en la longitud de la cripta en los ratones IL10/Nox1^{dkO}. De forma interesante, la SEM mostró un amplio espectro de alteraciones ultraestructurales de la mucosa idénticas tanto en los ratones IL10/Nox1^{dkO} como en la mucosa colónica no afectada de pacientes con CU que incluye una distorsión de la cripta, visibles aberturas en la cripta dispuestas en fila, unos bordes glandulares edematosos y una dilatación de la luz de la glándula. A pesar del aumento en la proliferación del colon, la tinción y la evaluación cuantitativa de las células apoptóticas indicó que la disminución en la expresión de las células caliciformes en los ratones IL10/Nox1^{dkO} era debida a un aumento en la apoptosis en el colon.

Para la evaluación del papel patógeno de las células caliciformes en la CU, se sometieron los ratones WT y Nox1^{KO} a la administración oral de DSS o a la administración rectal de TNBS. No se observaron diferencias significativas en la DAI ni daños histológicos en la mucosa del colon entre los dos modelos de ratón, lo que sugiere que la inflamación inducida químicamente es probablemente independiente del aumento en la expresión de las células caliciformes. Por el contrario, el tratamiento con tunicamicina, un inductor canónico del ERS, indujo significativamente una colitis más grave en los ratones que sobreexpresan las células caliciformes con respecto a los ratones WT, lo que indica que la propia célula caliciforme puede ser un participante directo en el desarrollo de la colitis como consecuencia del ERS. Consecuentemente, los ratones IL10/Nox1^{dkO} mostraron alteraciones del ERS en la mucosa del colon antes que unos daños inflamatorios, según se ha descrito previamente en los pacientes con CU ¹. Las ramas de señalización IRE1-beta y ATF6alfa estaban extendidas en las células epiteliales del colon, según evidenciaba un aumento en el corte y empalme del ARNm de *XBP-1*, la inducción de GRP78, de GRP94, de PDI tanto a nivel del ARNm como de las proteínas, y unas cisternas dilatadas y una grave distorsión del ER en las células caliciformes. De forma interesante, se observó una idéntica fosforilación defectuosa del eIF2α correlacionada con una baja ATF4 tanto en la mucosa del colon no afectada de los ratones IL10/Nox1^{dkO} como en los pacientes con CU ¹. Coherentemente con la reducida fosforilación del eIF2α, se detectó un aumento en la expresión de la PPP1R15A/GADD34, una proteína inducible por estrés que recluta la subunidad catalítica de la fosfatasa de proteína 1 y promueve la fosforilación del eIF2alfa, en concordancia con nuestros datos previos en seres humanos ¹. La fosforilación de EIF2alfa es citoprotectora durante el ERS, debido a que las células están sensibilizadas frente a la muerte celular cuando esta ruta está anulada genéticamente ³³ y están protegidas cuando es forzada ectópicamente ³⁴. Para probar si un inhibidor farmacológico selectivo de la fosforilación del eIF2alfa mediada por la GADD34 podría aliviar la colitis, se trataron ratones IL10/Nox1^{dkO} con 1 mg/kg de salubrinal ³⁵ durante hasta tres semanas. Demostramos que el salubrinal redujo de forma importante la puntuación de la colitis histológica en todo el colon, previno notablemente la infiltración de células inmunitarias y restauró la arquitectura de la mucosa intacta con células caliciformes normales. El salubrinal provocó una robusta fosforilación del eIF2alfa y protegió la mucosa del colon frente a la apoptosis, al menos en parte por su actividad anti-apoptótica sobre la expresión de la CHOP. Adicionalmente, había una tendencia a una reducción en la expresión de Grp78/Bip y de Grp94 en los ratones tratados con salubrinal, lo que demuestra que el salubrinal participa en el brazo de control de la traducción de las UPR mediante la inducción de la fosforilación del eIF2alfa, y actúa como un regulador de la proteostasis reduciendo el plegamiento de las proteínas en las células estresadas. De forma interesante, demostramos que la fosforilación inducida por el salubrinal del eIF2alfa se detectaba principalmente en las células epiteliales del colon. Finalmente, los niveles de citocinas proinflamatorias y la cantidad de linfocitos T_{reg} colónicos y esplénicos disminuyó fuertemente hasta su nivel basal en los ratones IL10/Nox1^{dkO} tratados con salubrinal.

Nuestros hallazgos refuerzan que la fosforilación defectuosa del eIF2alfa es un importante factor en la CU y puede abrir nuevas vías terapéuticas. Los tratamientos actuales de la CU no pueden cambiar el curso natural de la enfermedad. Estas dificultades para gestionar la CU pueden explicarse por el uso de inmunomoduladores, que están diseñados principalmente para modular la actividad de las células inmunitarias y que son muy poco eficaces en la reparación de las anomalías epiteliales tempranas. Por lo tanto, los moduladores del eIF2α podrían definir una nueva clase de fármacos basada específicamente en los mecanismos íntimos de la CU, que probablemente podrían cambiar el paradigma para el tratamiento de la CU desde los inmunomoduladores hacia los epiteliomoduladores.

50 REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Treton, X., et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141, 1024-1035 (2011).
2. Kaser, A., et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756 (2008).
3. Bertolotti, A., et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 beta-deficient mice. *J Clin Invest* 107, 585-593 (2001).
4. Brandl, K., et al. Enhanced sensitivity to DSS colitis caused by a hypomorphic *Mbtps1* mutation disrupting the ATF6-driven unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3300-3305 (2009).
5. Zhao, F., et al. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol* 338, 270-279 (2009).
6. Cao, S. S., Song, B. y Kaufman, R.J. PKR protects colonic epithelium against colitis through the unfolded protein response and prosurvival signaling. *Inflamm Bowel Dis* (2012).
7. Heazlewood, C. K., et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and

spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 5, e54 (2008).

8. Shkoda, A., et al. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* 132, 190-207 (2007).

9. Turner, M. J., et al. HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J Immunol* 175, 2438-2448 (2005).

10. Coant, N., et al. NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon. *Mol Cell Biol* 30, 2636-2650 (2010).

11. Tytgat, K. M., van der Wal, J. W., Einerhand, A. W., Buller, H. A. y Dekker, J. Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem Bio-phys Res Commun* 224, 397-405 (1996).

12. Gibson, P., Rosella, O., Nov, R. y Young, G. Colonic epithelium is diffusely abnormal in ulcerative colitis and colorectal cancer. *Gut* 36, 857-863 (1995).

13. Ron, D. y Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529 (2007).

14. Zhang, K. y Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462 (2008).

15. Van der Sluis, M., et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117-129 (2006).

16. Velcich, A., et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726-1729 (2002).

17. Gregorieff, A., et al. The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137, 1333-1345 e1331-1333 (2009).

18. Itoh, H., Beck, P. L., Inoue, N., Xavier, R. y Podolsky, D. K. A paradoxical reduction in susceptibility to colonic injury upon targeted transgenic ablation of goblet cells. *J Clin Invest* 104, 1539-1547 (1999).

19. Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J., Bellen, H. J. y Zoghbi, H. Y. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19, 2412-2417 (2005).

20. Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M. J. y Zoghbi, H. Y. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155-2158 (2001).

21. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. y Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274 (1993).

22. Jarry, A., et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest* 118, 1132-1142 (2008).

23. Kamizato, M., et al. Interleukin 10 inhibits interferon gamma- and tumor necrosis factor alpha-stimulated activation of NADPH oxidase 1 in human colonic epithelial cells and the mouse colon. *J Gastroenterol* 44, 1172-1184 (2009).

24. Valente, A. J., et al. Regulation of NOX1 expression by GATA, HNF-1alpha, and Cdx transcription factors. *Free Radic Biol Med* 44, 430-443 (2008).

25. Szanto, I., et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol* 207, 164-176 (2005).

26. Muise, A. M., et al. Single nucleotide polymorphisms that increase expression of the guanosine triphosphatase RAC1 are associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141, 633-641 (2011).

27. Cheng, G., Diebold, B. A., Hughes, Y. y Lambeth, J. D. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 281, 17718-17726 (2006).

28. Franke, A., et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40, 1319-1323 (2008).

29. Kanneganti, M., Mino-Kenudson, M. y Mizoguchi, E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011, 342637 (2011).

30. Fasseu, M., et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 5 (2010).

31. Pekow, J. R. y Kwon, J. H. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18, 187-193 (2011).

32. Yu, Q. T., et al. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 13, 191-199 (2007).

33. Scheuner, D., et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7, 1165-1176 (2001).

34. Jousse, C., et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163, 767-775 (2003).

35. Boyce, M., et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939 (2005).

36. Ruimy, R., et al. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small- subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 44, 416-426 (1994).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un modelo animal transgénico no humano para la colitis ulcerosa y sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal, que comprende una alteración dirigida en los genes de la interleucina 10 (IL10) y de la oxidasa de NADPH 1 (NOX1), de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, y en el que se lleva a cabo una apendicectomía o una extirpación del suelo cecal en el animal.
- 10 2. El modelo animal transgénico no humano según la reivindicación 1 que está inactivado para la IL-10 y la NOX1.
- 10 3. El modelo transgénico no humano según la reivindicación 1 o 2 que es un roedor, tal como un ratón o una rata.
- 15 4. Un método no terapéutico para el cribado de un compuesto candidato para su uso como fármaco para el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa y/o de sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria o el cáncer colorrectal, que comprende i) la administración del compuesto candidato a un modelo animal transgénico no humano que comprende una alteración dirigida en los genes de la interleucina 10 (IL10) y de la oxidasa de NADPH 1 (NOX1) de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, ii) la caracterización del fenotipo del modelo animal no humano después de la administración del compuesto candidato, y iii) la selección positiva del compuesto candidato que revierte o que retrasa el fenotipo de colitis ulcerosa en el modelo animal no humano.
- 20 5. El método de la reivindicación 4 en el que el modelo animal transgénico no humano está inactivado para la IL-10 y la NOX1.
- 25 6. El método de la reivindicación 4 o 5 en el que el modelo animal transgénico no humano es un roedor, tal como un ratón o una rata.
- 30 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en el que se lleva a cabo una apendicectomía o una extirpación del suelo cecal en el modelo animal transgénico no humano.
- 30 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en el que el compuesto candidato ha sido previamente caracterizado como un inhibidor de la PP1R15A/GADD34 que restaura la fosforilación del eIF2 α .
- 35 9. Uso de un animal transgénico no humano que comprende una alteración dirigida en los genes de la interleucina 10 (IL10) y de la oxidasa de NADPH 1 (NOX1) de forma que la IL10 y la NOX1 no son expresadas en dicho animal, como modelo de la colitis ulcerosa y de sus principales complicaciones, tales como la colangitis esclerosante primaria y el cáncer colorrectal.
- 40 10. El uso de la reivindicación 9 en el que el animal transgénico no humano está inactivado para la IL-10 y la NOX1.
- 40 11. El uso de la reivindicación 9 o 10 en el que el animal transgénico no humano es un roedor, tal como un ratón o una rata.
12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que se lleva a cabo una apendicectomía o una extirpación del suelo cecal en el animal transgénico no humano.