



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 601**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01998835 .1**

96 Fecha de presentación : **30.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1356298**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54

Título: **Diagnóstico de enfermedad.**

30

Prioridad: **30.11.2000 GB 0029225**
07.12.2000 GB 0029879

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2011

73

Titular/es:
CRAWFORD HEALTHCARE HOLDINGS LIMITED
Cheshire House 164 Main Road
Goostrey Cheshire CW4 8JP, GB

72

Inventor/es: **Tazi-Ahnini, Rachid;**
Bavik, Claes;
Ward, Simon;
Duff, Gordon y
Cork, Michael

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 601 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

Diagnóstico de enfermedad.

Campo

5 La presente invención se refiere al diagnóstico de enfermedades asociadas con la adhesión célula-célula reducida. Más particularmente, la invención se refiere al diagnóstico de ciertas enfermedades epidérmicas o de la piel.

Antecedentes

10 La piel es una barrera que retiene agua dentro del cuerpo y evita la penetración de agentes ambientales en el cuerpo. Por consiguiente, la función de barrera de la piel es esencial para la conservación de la homeostasis interna (Cork 1997). La epidermis se compone de capas de queratinocitos comprimidas estrechamente que se forman mediante la división en el estrato basal (o capa germinativa). A medida que los queratinocitos ascienden a través de las capas espinosa y granular, se diferencian y se forma una estructura interna rígida de queratina, microfilamentos y microtúbulos. El estrato córneo (capa córnea) está compuesto por capas de células muertas aplanadas que perdieron sus núcleos, entre las que se encuentra una mezcla compleja de lípidos y proteínas.

15 La barrera epidérmica está ubicada en el estrato córneo y depende de la adhesión fuerte entre los corneocitos (Egelrud, 2000). Esta adhesión está mediada por corneodesmosomas (Menton and Elisen, 1971 Chapman and Walsh, 1990; North et al, 1999). La corneodesmosina es una glicoproteína de los corneodesmosomas.

20 El otro componente de la barrera epidérmica son los lípidos laminares. Este lípido se secreta en los cuerpos laminares en el estrato granuloso (Elias 1983). En la interfaz entre el estrato granuloso y el estrato córneo, los lípidos se extraen de las células granulares hacia el espacio intercorneocitario. A continuación los lípidos se organizan en estructuras de dos capas multilaminares altamente organizadas (Landmann 1988). El estrato córneo puede visualizarse como una pared de ladrillos donde los corneocitos forman los ladrillos y los lípidos laminares la argamasa (Elias 1983). Los corneocitos contienen una sustancia que retiene el agua, el factor hidratante natural (FHN), que retiene el agua dentro de los mismos. El alto contenido de agua provoca que los corneocitos se hinchen, evitando la formación de fisuras y grietas entre ellos. La flexibilidad y elasticidad de la piel están directamente relacionadas con su contenido de agua. El estrato córneo sano normal tiene relativamente un alto contenido de agua.

30 Por consiguiente, el estrato córneo es una barrera que se reemplaza continuamente mediante la proliferación y diferenciación de queratinocitos en la epidermis viable. Para mantener un espesor constante del estrato córneo en un punto del cuerpo dado, las partes superficiales del estrato córneo deben desprenderse continuamente en el proceso de descamación a una velocidad que equilibra su producción. La descamación alterada de corneocitos es característica de varias enfermedades tales como psoriasis, acné vulgar, ictiosis y queratinosis pilaris, entre otras. En la psoriasis, la descamación alterada de corneocitos provoca un espesor aumentado del estrato córneo y la barrera por lo general se incrementa.

35 Haftek, M et al, (1997) usaron estudios inmunohistoquímicos e inmunoultraestructurales sobre la expresión de la corneodesmosina en varias lesiones cutáneas caracterizadas por la producción anormal y/o de la retención de la capa córnea de la epidermis para estudiar la expresión de la corneodesmosina en la capa granular y el estrato córneo de la epidermis normal y enferma.

40 Simon, M et al, (2001) J Invest Dermatol No. 116:23-30 investigan la persistencia de los corneodesmosomas periféricos y no periféricos en el estrato córneo superior de la xerosis cutánea de invierno con respecto solo a los periféricos en la piel normal.

Sumario

Los inventores demostramos que la proteólisis de las proteínas corneodesmosomales es un proceso clave implicado en la descamación.

45 Por lo tanto, los inventores descubrimos que la proteólisis aumentada, alterada o de otra forma anormal de las proteínas corneodesmosomales está implicada en varios trastornos cutáneos. En particular, descubrimos que la proteólisis aumentada de las proteínas de adhesión está implicada en enfermedades caracterizadas por la función de barrera alterada y la proteólisis disminuida de las proteínas de adhesión está implicada en enfermedades caracterizadas por la descamación alterada de corneocitos. Demostramos además que mutaciones en genes que codifican proteínas de adhesión resultan en adhesión reducida entre las células epiteliales.

50 Las reivindicaciones independientes 1 y 5 definen la invención en su alcance más amplio: Específicamente la presente invención proporciona un procedimiento para proporcionar indicaciones útiles en el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad asociada con la adhesión célula-célula disminuida entre células epiteliales en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en eccema

atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica, asma atópica pulmonar, asma postviral, hiperreactividad bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, úlcera péptica, impétigo, verrugas virales, Molluscum contagiosum, meningitis bacteriana, meningitis viral, úlcera péptica asociada a la penetración de *Helicobacteria pylori*, melanoma cutáneo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, linfoma cutáneo, un cáncer de piel, un proceso maligno del tracto gastrointestinal y un proceso maligno de los pulmones, comprendiendo el procedimiento la detección de una mutación en corneodesmosina seleccionada de la detección de uno cualquiera o más de:

- (a) la presencia de una T en la posición +1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
- (b) la ausencia de un sitio de enzima de restricción Hph1 en la posición de +1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
- (c) la presencia de un residuo de leucina (L) en la posición 394 de un polipéptido de corneodesmosina (L20815);
- (d) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (c);
- (e) los siguientes nucleótidos o uno cualquiera o más de los siguientes aminoácidos en las posiciones relevantes de un ácido nucleico o polipéptido de corneodesmosina:

Posición del nucleótido	442	468	619	1215	1236	1243	1515	1593
Ácido(s) nucleico(s)	A	AGT		T A T		T	G	T
Posición del residuo (1)	127	137	186	385	392	394	485	511
Posición del residuo (2)	143	153	202	401	408	410	501	527
Residuo	D	S/-	F	S	S	L	D	D/N

en el que "Posición del residuo (1)" se refiere a la numeración de la secuencia con el número de acceso L20815 y "Posición del residuo (2)" se refiere a la numeración de la secuencia con el número de acceso AF030130;

- (f) la presencia de una T en la posición 180 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
- (g) la presencia de una F en la posición 40 de un polipéptido de corneodesmosina que tiene el número de acceso L20815;
- (h) la presencia de una F en la posición 56 de un polipéptido de corneodesmosina que tiene el número de acceso AF030130;
- (i) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (g) o (h);
- (j) la presencia de una T en la posición 619 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
- (k) la presencia de una F en la posición 186 de un polipéptido de corneodesmosina; y
- (l) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (k), en una muestra de células o fluido corporal obtenida de un sujeto.

Específicamente la presente invención también proporciona un procedimiento para proporcionar indicaciones útiles en el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad asociada con la adhesión célula-célula disminuida entre células epiteliales en un individuo, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: eccema atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica e impétigo, comprendiendo el procedimiento detectar la presencia, ausencia o un nivel modulado de corneodesmosina o un fragmento de la misma, en una muestra de células o fluido corporal obtenida de un sujeto.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de corneodesmosina AF030130.1 de GenBank.

La Figura 2 muestra la secuencia de corneodesmosina L20815.1 de GenBank.

Descripción detallada

Los inventores demostramos que la proteólisis regulada de las proteínas de adhesión es importante para una piel sana. Mostramos que una causa subyacente de varias enfermedades de la piel es la degradación en la regulación de la proteólisis de las proteínas de adhesión, que conduce a una adhesión aumentada, disminuida o de otra forma anormal entre corneocitos. Tal proteólisis anormal puede tener varias causas, incluyendo mutaciones en genes de proteínas de adhesión, mutaciones en proteasas que actúan sobre proteínas de adhesión y/o en inhibidores de proteasa que actúan sobre tales proteasas y regulan su actividad.

Los inventores mostramos que el tratamiento y la prevención de tales enfermedades pueden lograrse modulando la proteólisis de las proteínas de adhesión. También demostramos que la detección de tales mutaciones en las proteínas de adhesión, proteasas y/o inhibidores de proteasa puede usarse para diagnosticar varias enfermedades de la piel y/o susceptibilidad a tales enfermedades.

Por consiguiente, por ejemplo, los inventores mostramos que las mutaciones dentro de genes que codifican proteínas de adhesión, tales como corneodesmosina (gen S) resultan en una adhesión reducida o aumentada entre células epiteliales tales como corneocitos, que conduce a la enfermedad. Adicionalmente, las mutaciones dentro de genes relacionados con tales proteínas de adhesión, por ejemplo, genes dentro del complejo génico epidérmico MHC en el cromosoma 6p21 también resulta en adhesión reducida entre las células epiteliales. Identificamos mutaciones específicas en varias posiciones, incluidas +1243, +180 y +619 y las relacionamos con enfermedades de Grupo I y Grupo II.

Adicionalmente, los inventores mostramos que las mutaciones dentro de genes que codifican enzimas proteolíticas (tales como los genes de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) y/o de las enzimas tripticas del estrato córneo (SCTE) en el cromosoma 19 en la banda q13 y genes de serina proteasas relacionados en el cromosoma 17 resultan en una actividad aumentada de estas enzimas y como resultado la descamación prematura de corneocitos. En particular, identificamos la asociación de una secuencia AACCAACC con eccema atópico y otras enfermedades de Grupo I.

Adicionalmente, las mutaciones en genes de inhibidores de serina proteasa tales como SKALP y SLPI conducen a fallas en la regulación del proceso de descamación. Por consiguiente, por ejemplo, las mutaciones en los genes S, SCCE, SCTE, SKALP, SLPI o cualquier combinación de estos genes resultan en alteraciones de la función de la barrera epidérmica. Las mutaciones que ocurren juntas en los genes aumentan la gravedad del defecto en la función de barrera epidérmica.

Por consiguiente, los inventores proporcionamos procedimientos de diagnóstico de una enfermedad asociada con la adhesión célula-célula anormal entre células epiteliales mediante la detección de tales mutaciones. Adicionalmente, también proporcionamos procedimientos de tratamiento de una enfermedad asociada con la adhesión célula-célula anormal entre células epiteliales mediante la regulación de la expresión de tales genes de proteasa e inhibidores de proteasa.

Cuando se hace referencia al "diagnóstico" de una enfermedad, debe considerarse que éste incluye el diagnóstico de la enfermedad en sí misma así como también de la susceptibilidad a la enfermedad. Los procedimientos de diagnóstico divulgados en la presente también pueden emplearse como procedimientos para proporcionar indicaciones útiles en el diagnóstico de enfermedades.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se utilizan técnicas estándares para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (ver en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc., procedimientos químicos, formulaciones farmacéuticas y administración y tratamiento de pacientes.

Función de barrera epidérmica

Los procedimientos y composiciones descritas en la presente se ocupan principalmente del diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades asociadas o caracterizadas por una función de barrera epidérmica anormal.

La piel es una barrera que retiene agua dentro del cuerpo y evita la penetración de agentes ambientales en el cuerpo. Esta capacidad para resistir la penetración es esencial para la conservación de la homeostasis interna (Cork 1997). La epidermis se compone de capas de queratinocitos comprimidas estrechamente que se forman mediante la división en el estrato basal (o capa germinativa). A medida que los queratinocitos ascienden a través de las capas espinosa y granular, se diferencian y se forma una estructura interna rígida de queratina, microfilamentos y microtúbulos. Dentro de la epidermis, la función de barrera típicamente la desempeña el estrato córneo y depende de la adhesión fuerte entre los corneocitos (Egelrud, 2000) mediada por los corneodesmosomas (Menton and Elisen, 1971; Chapman and Walsh, 1990; North et al, 1999).

El estrato córneo (capa córnea) está compuesto por capas de células muertas aplanadas que perdieron sus núcleos, entre las que se encuentra una mezcla compleja de lípidos y proteínas. El estrato córneo es una barrera que se reemplaza continuamente mediante la proliferación y diferenciación de queratinocitos en la epidermis viable. Para mantener un espesor constante del estrato córneo en un punto del cuerpo dado, las partes superficiales del estrato córneo deben desprenderse continuamente en el proceso de descamación a una velocidad que equilibra su producción.

Las expresiones "función de barrera" de la epidermis o la "función de barrera epidérmica", tal como se usan en el presente documento, pretenden por lo tanto referir a la capacidad de una capa epidérmica para resistir la penetración de un agente externo. Por consiguiente, los procedimientos y composiciones actúan modulando la función de barrera epidérmica de un individuo. En particular, los procedimientos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para tratar y/o diagnosticar enfermedades en las que la barrera epidérmica en los

individuos que sufren tales enfermedades se modula, es decir, se incrementa o debilita, en comparación con la barrera epidérmica en individuos normales.

5 La medición de la función de barrera puede llevarse a cabo de varias formas. Por ejemplo, puede usarse un sistema celda de Franz y cadáver (también conocido como sistema de penetración de celda de Franz). Este sistema mide la función de barrera midiendo las sustancias que pasan a través de la misma y tiene la ventaja de ser un sistema fácil, rápido y sólido.

Función de barrera alterada

La función de barrera alterada es una característica de las enfermedades de Grupo I, descritas en detalle más adelante.

10 Una epidermis tiene una función de barrera alterada cuando es más permeable a un agente externo que una epidermis sana, normal del mismo u otro individuo. Por consiguiente, una epidermis con función de barrera alterada permite más penetración de un agente externo que si fuera de otra forma. Preferiblemente, una epidermis con función de barrera alterada es 20%, 40%, 60%, 80% o 100% o más permeable a un agente externo que una epidermis normal. Preferiblemente, una molécula que sustancialmente no es capaz de cruzar una barrera epidérmica normal es capaz de cruzar la barrera de una epidermis con función de barrera alterada.

15 El aumento en la penetración o permeabilidad preferiblemente se refleja mediante el aumento de masa de un agente o fármaco, actividad de un agente o fármaco (tal como una actividad química, biológica o enzimática relevante) que es capaz de pasar a través de la capa epidérmica. Por consiguiente, una epidermis con función de barrera alterada por tanto preferiblemente permitirá la penetración de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 20 80%, 90% o 100% o más de un agente o fármaco que una epidermis normal.

25 El aumento en la permeabilidad o penetración también puede reflejarse mediante una relación aumentada de moléculas que pasan en comparación con aquellas que se retrasan o de forma alternativa, en comparación con aquellas que se aplican. Dicha relación, N, puede aumentarse en 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% o más con los procedimientos y composiciones descritas en la presente.

30 La medición de la función de barrera epidérmica puede llevarse a cabo de varias formas. De forma similar, el nivel o grado de penetración de un agente o composición puede determinarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el radioetiquetado de un compuesto activo o un compuesto indicador, con posterior medición de la cantidad de compuesto radioetiquetado absorbido por la piel permite que un experto en la técnica determine los niveles de la composición absorbida utilizando cualquiera de diversos procedimientos para determinar la penetración cutánea del compuesto de prueba. También puede llevarse a cabo la medición de una cantidad de compuesto radioetiquetado que cruza la capa cutánea.

35 En una realización preferida, se usa un sistema celda de Franz y cadáver (también conocido como sistema de penetración de celda de Franz) para medir la penetración de un agente. Este sistema mide la función de barrera permitiendo la medición de la cantidad de compuesto radioetiquetado que pasa a través de un trozo de piel hasta un fluido recipiente. La celda de Franz tiene la ventaja de ser un sistema fácil, rápido y sólido, y se describe en más detalle a continuación.

Función de barrera incrementada

40 Una epidermis que tiene una función de barrera aumentada es menos permeable a un agente externo que una epidermis sana, normal del mismo u otro individuo.

Enfermedades de Grupo I: asociadas con la adhesión célula-célula disminuida

45 En una realización, los procedimientos divulgados en la presente son adecuados para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades asociadas con la adhesión célula-célula disminuida, en particular de células epiteliales, en particular corneocitos. Tales enfermedades se denominan en este documento "enfermedades de Grupo 1" y son por lo tanto enfermedades de función de barrera alterada o reducida.

Dentro de las enfermedades de Grupo 1 pueden identificarse tres subgrupos. En cada grupo la función de barrera alterada es permitir la penetración de un xenobiótico a través de una barrera epitelial. Una vez que el xenobiótico penetra a través de la barrera epitelial, interactúa con las células del huésped para producir el fenotipo de la enfermedad.

50 Un primer subgrupo de las enfermedades de Grupo 1 (Subgrupo 1.1) se caracteriza por una barrera alterada que permite la penetración de un xenobiótico irritante, alergeno u otro. Estos xenobióticos interactúan con el sistema inmunológico del cuerpo para producir una respuesta inflamatoria anormal que a su vez provoca destrucción de tejido. La respuesta inmunitaria al xenobiótico puede incrementarse como resultado de una predisposición genética asociada. Ejemplos de tales enfermedades que afectan la piel incluyen eccema atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa y dermatitis de contacto alérgica. Ejemplos de tales enfermedades que

afectan los pulmones incluyen: asma atópica, asma postviral/hiperreactividad bronquial y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Ejemplos de tales enfermedades que afectan los intestinos incluyen: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca y úlcera péptica.

5 Un segundo subgrupo de enfermedades de Grupo 1 (Subgrupo 1.2) se caracteriza por una barrera alterada que permite la penetración de bacterias, virus, otros microorganismos o productos de microorganismos, por ejemplo, exotoxina superantigénica. El microorganismo y/o el producto de microorganismo luego conduce a un proceso de enfermedad. Ejemplos de tales enfermedades incluyen eccema atópico, dermatitis de contacto, impétigo, verrugas virales, Molluscum contagiosum, meningitis (bacteriana y viral) y úlcera péptica causada o asociada con la penetración de Helicobacteria pylori.

10 Un tercer subgrupo de las enfermedades de Grupo 1 (Subgrupo 1.3) se caracteriza por una barrera alterada que permite la penetración de un carcinógeno. De ese modo el carcinógeno puede acceder a la población de células madre epiteliales y puede inducir la transformación. El carcinógeno puede actuar como un co-carcinógeno con otros agentes ambientales, por ejemplo, radiación ultravioleta. Ejemplos de tales enfermedades que afectan la piel incluyen melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, linfoma cutáneo y otros cánceres de piel. Ejemplos de tales enfermedades que afectan los intestinos incluyen procesos malignos de todo el tracto gastrointestinal. Procesos malignos de los pulmones son ejemplos de enfermedades que afectan a los pulmones.

Tratamiento de enfermedades de Grupo 1

20 De acuerdo con los procedimientos y composiciones descritas en la presente, las enfermedades de Grupo 1 resultan de una adhesión disminuida entre células epiteliales, por ejemplo corneocitos en la piel. Esto puede surgir como resultado de cambios en la expresión, actividad y/o degradación de proteínas de adhesión que modulan o son responsables de la adhesión entre células epiteliales, por ejemplo, corneodesmosina, cambios en la expresión, actividad y/o degradación de proteasas que degradan las proteínas de adhesión y/o cambios en la expresión, actividad y/o degradación de inhibidores de proteasas que degradan las proteínas de adhesión. Hemos descubierto que un cambio en cualquiera, alguno o todos los mencionados anteriormente puede resultar en adhesión disminuida entre células epiteliales tales como corneocitos.

30 Como ejemplo, una proteína de adhesión cuya estructura cambia como resultado de una mutación genética puede tener actividad de adhesión reducida y/o ser más vulnerable a la degradación mediante enzimas proteolíticas (proteasas). Por consiguiente, el tratamiento de enfermedades de Grupo 1 por tanto puede lograrse aumentando la expresión de una proteína de adhesión, por ejemplo, corneodesmosina. De forma alternativa o en tratamiento conjunto puede lograrse potenciando la actividad de adhesión y/o la resistencia a la proteasa de la proteína de adhesión. Por lo tanto, la proteína de adhesión responsable de la adhesión célula-célula reducida puede reemplazarse o complementarse con otra proteína de adhesión o una variante de la primera proteína de adhesión con actividad de adhesión y/o resistencia a proteasa incrementada.

35 Adicionalmente, un aumento en la cantidad, actividad y/o biodisponibilidad de proteasas puede provocar una degradación aumentada de proteínas de adhesión. Por consiguiente, una enfermedad de Grupo 1 por tanto puede tratarse reduciendo la expresión y/o actividad de una proteasa responsable de la degradación de una proteína de adhesión. Por ejemplo, la transcripción y/o traducción de tal proteasa puede regularse hacia abajo como medio para tratar enfermedades de Grupo 1. Por lo tanto, la expresión de proteasas tales como SCCE y SCTE puede disminuirse en el nivel transcripcional y/o translacional para tratar una enfermedad de Grupo 1.

40 La función de barrera alterada como resultado de adhesión célula-célula reducida también puede presentarse cuando hay una cantidad, actividad y/o biodisponibilidad disminuida de un inhibidor de una proteasa que degrada una proteína de adhesión. Por lo tanto, una combinación de cualquiera, alguno o todos los cambios mencionados anteriormente puede resultar en una disminución mayor en la adhesión célula-célula y función de barrera alterada.

45 Por tanto, la expresión y/o actividad de un inhibidor de proteasa que es capaz de inhibir una actividad proteasa capaz de provocar una degradación en una proteína de adhesión puede regularse hacia arriba como medio para tratar una enfermedad de Grupo 1. El inhibidor de proteasa cuya expresión y/o actividad se regula hacia arriba puede ser el inhibidor de proteasa natural que inhibe fisiológicamente la proteasa en cuestión (es decir, la proteasa responsable de la proteólisis de la proteína de adhesión). Tal inhibidor de proteasa se denomina en la presente inhibidor de proteasa "primario". Por consiguiente, proporcionamos un procedimiento para tratar una enfermedad de Grupo 1 activando la transcripción y/o traducción de inhibidores de proteasa (por ejemplo, SKALP y SLPI) para disminuir la actividad de proteasas tales como SCCE y SCTE. Adicionalmente, los inhibidores de proteasa secundarios (es decir, inhibidores de proteasa que normalmente no están implicados en la regulación fisiológica de la actividad proteasa) también pueden usarse para complementar y/o reemplazar la actividad del inhibidor de proteasa primario.

55 Adicionalmente, los procedimientos y las composiciones descritos en la presente incluyen la administración de un inhibidor de proteasa o un fragmento de un inhibidor de proteasa a un individuo que padece o es probable que padezca una enfermedad de Grupo I. El inhibidor de proteasa y/o fragmento puede administrarse en forma de un

péptido natural o sintético. Preferiblemente, el péptido comprende una porción activa de un inhibidor de proteasa. Preferiblemente, el péptido es capaz de inhibir una o más actividades proteasa. Los péptidos adecuados pueden diseñarse contra cualquier inhibidor de proteasa, incluidos el inhibidor de la leucoproteasa secretora (SLPI), inhibidor de proteasa 3 elafina (PI3 o SKALP) o cistatina A (CSTA).

5 Preferiblemente, el péptido se selecciona del grupo que consiste en: CGKS (SB7a) y CGKS CVSPVKA (SB7b); KIIDGA; GDKIIDGA; GDKIID; KII; KIID; KIIDG; KIIDGA; LDPVD (651); KRDLK (652); LDPVDTPNP (653); LDPVDTP- NPTRRKPG (654); CGKSCVSPVKA (644); CVSPVKA (643). En una realización preferida, el péptido comprende Péptido 643, Péptido 651 o Péptido 653.

10 Adicionalmente, cuando se descubre que los inhibidores naturales de proteasas tales como las enzimas quimotripsina/tripsina del estrato córneo son deficientes o muestran actividad reducida, estos pueden reemplazarse o complementarse con inhibidores de proteasa secundarios tales como quimotripsina, inhibidor de la tripsina de soja, catepsina G u otros inhibidores de proteasa conocidos en la técnica. Los inhibidores de proteasa primarios incluyen antileucoproteasa y elafina. Tales inhibidores de proteasa primarios y/o secundarios pueden aplicarse sistémicamente o preferiblemente a la superficie epitelial en forma de una composición farmacéutica tal como se describe en más detalle a continuación.

15 Usando la piel como ejemplo, un inhibidor de proteasa puede aplicarse a la superficie epitelial, antagonizando el inhibidor de proteasa por ejemplo la enzima quimotripsina del estrato córneo. Tal inhibidor de proteasa puede formularse en una base emoliente. El o los inhibidores de proteasa inhibirán la degradación de proteínas de adhesión tales como corneodesmosina y como resultado aumentarán la cohesión entre corneocitos y mejorará la estructura y/o resistencia de la barrera epidérmica.

20 La expresión de uno o más genes que codifican inhibidores de proteasa, ya sean inhibidores de proteasa primarios o inhibidores de proteasa secundarios, puede usarse para aumentar la actividad inhibitoria de proteasa. Por ejemplo, proporcionamos la inyección subcutánea (o de otra forma) de vectores de expresión que expresan, por ejemplo, quimotripsina, inhibidor de la tripsina de soja, catepsina G u otros inhibidores de proteasa para aumentar la actividad inhibitoria de proteasa para reducir la proteólisis de la proteína de adhesión. Adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, la producción endógena de inhibidores de proteasa primarios puede incrementarse mediante la regulación hacia arriba de la transcripción y/o traducción de los genes del inhibidor de proteasa relevantes mediante medios conocidos en la técnica.

25 Adicionalmente, proporcionamos la desactivación de una forma patógena de una proteína epitelial o desmosomal y/o la activación de formas no patógenas de proteínas epiteliales o desmosomales para tratar enfermedades de Grupo 1. Por lo tanto, en pacientes heterocigotos, la expresión de una forma no patógena de una proteína desmosomal, por ejemplo, corneodesmosina, puede regularse hacia arriba mediante medios conocidos en la técnica. De forma alternativa, o en combinación, la expresión de una forma patógena de una proteína desmosomal, por ejemplo, corneodesmosina, puede regularse hacia abajo mediante medios conocidos en la técnica. Las formas patógenas y no patógenas de tales proteínas pueden identificarse mediante medios conocidos en la técnica tales como análisis genético y perfiles proteolíticos y tal como se describe en detalle más adelante.

Diagnóstico de enfermedades de Grupo 1

30 Las mutaciones en proteínas de adhesión, proteasas y/o inhibidores de proteasa se asocian con enfermedades de Grupo I. Tales mutaciones se describen en los Ejemplos A1 a A6 y B1 a B6. Cualquiera de estas mutaciones puede detectarse en el gen, ácido nucleico o polipéptido relevante para diagnosticar una enfermedad de Grupo I.

Enfermedades de Grupo II: asociadas con la adhesión célula-célula aumentada

35 Las enfermedades caracterizadas por la adhesión célula-célula aumentada de células epiteliales, en particular corneocitos, se denominan en el presente documento "enfermedades de Grupo 2". Las enfermedades de Grupo 2 por lo tanto son enfermedades de función de barrera aumentada o incrementada.

Enfermedades de Grupo II

Ejemplos de enfermedades de Grupo 2 incluyen psoriasis, las ictiosis, acné vulgar y queratosis pilaris.

40 Las enfermedades de Grupo 2 pueden resultar de la adhesión aumentada entre las células epiteliales, por ejemplo corneocitos en la piel. La adhesión aumentada resulta en un espesor aumentado del estrato córneo. Por ejemplo, en la psoriasis y las ictiosis se presenta un engrosamiento generalizado del estrato córneo. En el acné se presenta un engrosamiento focal localizado del estrato córneo en la entrada al conducto pilosebáceo.

45 La adhesión aumentada puede surgir como resultado de cambios en la expresión, actividad y/o degradación de proteínas de adhesión que modulan o son responsables de la adhesión entre células epiteliales, por ejemplo, corneodesmosina, cambios en la expresión, actividad y/o degradación de proteasas que degradan las proteínas de adhesión y/o cambios en la expresión, actividad y/o degradación de inhibidores de proteasas que degradan las

proteínas de adhesión. Hemos descubierto que un cambio en cualquiera, alguno o todos los mencionados anteriormente puede resultar en adhesión aumentada entre células epiteliales tales como corneocitos.

Proteína de adhesión

5 Cuando el término "proteína de adhesión" se usa en este documento, debe considerarse como una referencia a cualquier proteína, polipéptido o péptido que media la adhesión entre células. Por lo tanto, una "proteína de adhesión" incluye cualquier proteína implicada en la adhesión célula-célula.

10 Preferiblemente, la proteína de adhesión media la interacción célula-célula entre células epiteliales, es decir, la proteína de adhesión es una proteína de adhesión de célula epitelial. Preferiblemente, la proteína de adhesión media la interacción célula-célula entre células epidérmicas. Más preferiblemente, la proteína de adhesión media la adhesión célula-célula entre corneocitos. Preferiblemente, la proteína de adhesión se ubica en un corneodesmosoma. Más preferiblemente, la proteína de adhesión es una proteína desmosomal o una proteína corneodesmosomal.

15 La proteína de adhesión puede seleccionarse de forma adecuada del grupo que consiste en proteínas de adhesión que se muestran en las Tablas D 5.1. Preferiblemente, la proteína de adhesión se selecciona del grupo que consiste en: corneodesmosina (AF030130), desmoplaquina (XM_004463), placoglobina (NM_002230); (NM_021991), desmogleína 1 (XM-008810), desmocolina 1 (MX008687), envoplaquina (XM008135 ; U72543), plectina 1 (NM000445), S100A2 (AI539439 ; M87068), queratina 6A (L42611), queratina 17 (Z19574), S100A8 (AI126134), S100A7 (AA586894), S100A9, GB: W72424, SPRR2A, GB: M21302, SPRR1B (M19888), SPRK (AI923984), HCR (BAA81890), SEEK1 (BAA88130), SPR1 (BAB63315), STG (BAA88132), involucrina (NM005547), anexina A1/lipocortina (X05908), colágeno, tipo VI, alfa 3 (COL6A3) (NM_004369), trichialina (NM_005547) y loricrina (XM_048902). Los números de acceso a GenBank se proporcionan entre paréntesis.

20 Las proteínas de adhesión particularmente preferidas comprenden cualquiera de las proteínas desmosomales corneodesmosina (también conocida como S; AF030130), desmogleína 1 (XM_008810), desmocolina 1 (MX_008687), desmoplaquinas I y II (XM_004463), placoglobina (también conocida como PG; NM_002230) y placofilina (también conocida como PP).

25 Las proteínas de adhesión altamente preferidas incluyen corneodesmosina, desmogleína 1, desmogleína 3, placoglobina, desmoplaquina, desmocolina 1, envoplaquina, una proteína rica en prolina, preferiblemente una proteína rica en prolina pequeña (SPRR), SPRR2A, SPRR1 B, SPRK, SPRR2E, SPRR2F, SPRR2B, SPRR2D, SPRR2C, SPRR2G, SPRR1 A, SPRR3, SPRR4, involucrina o loricrina.

30 Las mutaciones y polimorfismos en cualquiera de las proteínas de adhesión mencionadas anteriormente que conducen o están asociadas a la adhesión aumentada o disminuida entre células epidérmicas pueden detectarse mediante procedimientos descritos en detalle en los Ejemplos. Tales cambios pueden detectarse como medio para identificar o diagnosticar una enfermedad de la piel o la susceptibilidad a tal enfermedad.

Corneodesmosina

35 Las mutaciones en proteínas de adhesión pueden detectarse como medio para diagnosticar una enfermedad de la piel o la susceptibilidad a tal enfermedad. En una realización altamente preferida, la proteína de adhesión es corneodesmosina.

40 El gen de corneodesmosina es muy polimórfico. A la fecha existen diecinueve variantes descritas en la literatura (Kasahara et al 1997, Jenisch et al, 1999). Estos polimorfismos se conservan altamente en lugar de ser esporádicos y creemos que se seleccionaron durante la evolución vertebrada. Debido a la función de barrera de la piel se han seleccionado algunas formas de la corneodesmosina que proporcionan una resistencia alta y/o función dinámica a la piel. Se ha mostrado una asociación fuerte entre la variante de corneodesmosina en la posición +1243 y la psoriasis crónica en placas (Tazi- Ahnini et al, 1999b). Esta asociación es aún más fuerte en la psoriasis guttata (Tazi-Ahnini et al, 1999b). La sustitución en la posición +1243 proporciona un cambio de aminoácido L394S. Creemos que esta sustitución interfiere con el procesamiento de la corneodesmosina, contribuyendo por lo tanto a la perturbación de la descamación. Hemos descubierto que nueve de los polimorfismos de corneodesmosina que proporcionan cambio de aminoácido (Ser143/Asp, Ser153/-, Leu180/Phe, Ser202/Phe, Ser401/Gly, Ser408/Ala, Gly409/Val, Ser410/Leu, Asp527/Asn) tienen una función importante en la maduración de los queratinocitos y el proceso de descamación. El procedimiento de detección para estos polimorfismos se describe en Jenisch et al, 1999 y Guerrin et al, 2001. Mostramos que existe una relación fuerte entre el proceso proteolítico de la corneodesmosina y la sensibilidad de la piel normal y también con enfermedades que incluyen psoriasis, acné, eccema en las que la función de barrera está alterada.

50 En los Ejemplos los inventores mostramos que las mutaciones en corneodesmosina se asocian con enfermedades de la piel, particularmente enfermedades de adhesión disminuida.

55 En particular, los inventores demostramos en los Ejemplos que un nucleótido T en la posición +1243 de la secuencia de corneodesmosina (AF030130) está asociado con enfermedades de adhesión cutánea disminuida.

La presencia de un nucleótido T en esta posición conduce a un residuo de treonina (T) en la posición 394 del polipéptido de corneodesmosina codificado. La detección de cualquiera o ambos puede usarse para el diagnóstico de enfermedades.

5 Por consiguiente, los inventores divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de adhesión cutánea disminuida (una enfermedad de Grupo I) o susceptibilidad a tal enfermedad en un individuo, mediante la detección de la presencia de una T en la posición +1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina en un individuo. También proporcionamos el diagnóstico de tal enfermedad o susceptibilidad a la misma mediante detección de un residuo de treonina (T) en la posición 394 de un polipéptido de corneodesmosina en un individuo. Las enfermedades de Grupo I también pueden diagnosticarse mediante detección de un alelo de corneodesmosina CD5 o CD6 en un individuo; la secuencia de los alelos CD5 y CD6 se describe en Jenisch et al.

Preferiblemente, la enfermedad de Grupo I es eccema o dermatitis. Más preferiblemente, la enfermedad de Grupo I es eccema atópico o dermatitis herpetiforme. Otros ejemplos de enfermedades de Grupo I se indican en una sección aparte en el presente documento.

15 Otras mutaciones se divulgan en los Ejemplos en +619 y +180 de ácido nucleico de corneodesmosina; éstas y los cambios de polipéptido correspondientes pueden detectarse para diagnosticar una enfermedad de Grupo I o Grupo II. En los Ejemplos se divulgan otros procedimientos de diagnóstico y tratamiento que emplean corneodesmosina.

Proteasas

20 Las proteasas que pueden usarse en los procedimientos y composiciones descritas en la presente incluyen las siguientes: ARNm de proteasa de cisteína relacionada a apoptosis (CASP14) (NM_012114), Transglutaminasa 1 (TGM1) (M98447), TGM2 (XM_009482), TGM4 (XM_056203), TGM5 (XM_007529), TGM7 (NM_052955), TGM3 (L10386), fosfolipasas A (2) (BC013384), antígeno CD47 (X69398), calicreína 8 (AB008390), proteína AD024 (XM_002642), SCCE (XM_009002), defensina Beta2 (AF0711216), proteína 27 inducible por interferón α (X67325), proteína de unión a ácido graso FABP5 (M94856), SCTE (XM_009000), calicreína 1, renal/pancreática/salival (KLK1) (XM_047300), calicreína Homo sapiens 2, prostática (KLK2) (XM_031757), calicreína 3, (antígeno específico de próstata) (KLK3) (XM_031768), calicreína 6 (neurosina, zima) (KLK6) (XM_055658), calicreína 4 (prostata, matriz del esmalte, próstata) (KLK4) (XM_008997), serina proteasa 1 tipo membrana (AF133086), colagenasa de piel humana (M13509), colagenasa MMP-1 (LOC116389), colagenasa MMP-12 (U78045), colagenasa MMP-9 (NM_004994), colagenasa MMP-3 (U78045), colagenasa MMP-28 (AF219624), caspasa 7 (BC015799), Caspasa 5 (NM_004347), Caspasa-14 (NM_012114), proteasa específica para ubiquitina USP-5 (NM_003481), proteasa específica para ubiquitina USP-11 (NM004651), proteasa específica para ubiquitina USP 6 (NM_004505), proteasa específica para ubiquitina USP 26 (NM_031907), proteasa específica para ubiquitina (USP 28) (NM_020886), subunidad 4 de proteasa 26S, LILRB 1 (AF004230), transductor de señal y activador de transcripción de 1,91 kDa (STAT1) (977935), proteasoma (prosoma, macropain) subunidad 6 (PSMA6) (X59417), TPS1 (NM_003293), TPSB1 (XM_016204), TPSG1 (XM_008123), proteasa nexina-II (XM_047793), precursor de nexina derivada de la glía (P07093), subunidad reguladora de proteasa 26S S10B y PCOLN3 (XM_047524).

40 Preferiblemente, la proteasa es una implicada o que es capaz de provocar la proteólisis de una proteína de adhesión, preferiblemente una proteína de adhesión célula-célula epidérmica tal como corneodesmosina. Por consiguiente, en una realización preferida, la proteasa comprende una proteasa seleccionada del grupo que consiste en: enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), enzima triptica del estrato córneo (SCTE), calicreína 1, calicreína 2, calicreína 3, calicreína 4, calicreína 6 y calicreína 8.

Enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE)

Enzima triptica del estrato córneo (SCTE)

45 La enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o calicreína 7 (KLK7) así como la enzima triptica del estrato córneo (SCTE) o calicreína 5 (KLK5) son miembros de la gran familia de serina proteasas. El análisis de sus perfiles de expresión sugiere su especificidad cutánea. Ambas enzimas se expresan en queratinocitos altos suprabasales y la epidermis interfolicular y tienen actividad máxima en el pH fisiológico del estrato córneo (Ekholm et al, 2000; Egelrud, 1993, Ekholm and Egelrud, 1998).

50 La SCCE y la SCTE se transportan al espacio extracelular del estrato córneo durante la cornificación. La SCCE se produce como un precursor inactivo y se necesita una enzima de activación para conferir a SCCE su actividad proteolítica. Se cree que SCTE es la enzima implicada en la activación de SCCE. Se ha mapeado un grupo de genes de calicreína que incluye SCCE y SCTE en el cromosoma 19q13.3-13.4. Esto incluye al menos 6 miembros relacionados estructuralmente y evolutivamente (KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, SCCE y SCTE). Cada uno de estos genes de calicreína puede usarse en los procedimientos y composiciones descritas en la presente.

De dicho grupo, la SCCE y SCTE se expresan principalmente en la piel. También se expresan en otros tejidos tales como cerebro, riñón, glándulas mamarias y salivales (Yousef et al, 2000; Yousef and Diamandis, 1999).

Mostramos que la presencia de AACCAACC en el ácido nucleico de SCCE está asociada con enfermedades de adhesión cutánea disminuida, en particular eccema (preferiblemente eccema atópico). Por consiguiente, proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de adhesión cutánea disminuida (una enfermedad de Grupo I) o susceptibilidad a tal enfermedad en un individuo, detectando la presencia de una repetición de AACC o la secuencia AACCAACC de un ácido nucleico de SCCE en un individuo.

También pueden usarse homólogos de SCCE y SCTE, en particular, homólogos que están ubicados en la piel y/o que actúan sobre proteínas de adhesión en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente. Tales homólogos puede identificarse mediante detección convencional de biblioteca usando una sonda de SCCE y/o SCTE, así como también exploración en bases de datos usando secuencias relevantes.

Ejemplos de otras proteasas útiles en los procedimientos y composiciones descritas en la presente incluyen aminopeptidasa M, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa Y, caspasa 1,4,5, caspasa 2,3,7, caspasa 6,8,9, quimotripsina, Factor Xa, pepsina, TEV, trombina, tripsina, etc.

Inhibidores de proteasa

Los inventores demostramos que la regulación de la descamación no se controla solamente mediante proteasas (por ejemplo, SCCE y SCTE) sino también mediante sus inhibidores. Los inhibidores de proteasa que pueden usarse en los procedimientos y composiciones descritas en la presente incluyen los siguientes:

Inhibidor de la leucoproteasa secretora (SLPI) y Elafina

Diversas serina proteasas están presentes en la epidermis humana incluyendo antileucoproteasa (antileucoproteasa derivada de la piel) y elafina. La antileucoproteasa es un inhibidor potente de SCCE. El inhibidor de proteasa 3 elafina (PI3 o SKALP) es otro inhibidor de serina proteasas producido por queratinocitos. Se sobreexpresa en las capas subcorneales de piel psoriásica lesional y en otros trastornos cutáneos tales como el síndrome de Behcet, el síndrome de Sweet, pioderma gangrenoso y vasculitis alérgica cutánea (Tanaka et al. 2000). Hemos descubierto que cambios en la expresión de SKALP afectan las actividades de SCCE y SCTE y por lo tanto alteran la estructura de las capas superficiales de la epidermis en trastornos cutáneos tales como psoriasis y eccema.

Se pretende que las expresiones "inhibidor de la leucoproteasa secretora", "SLPI" y "antileucoproteasa" tales como se usan en el presente documento sean sinónimas entre sí.

La elafina también se conoce como antileucoproteasa derivada de la piel, SKALP e inhibidor de proteasa 3 (PI3). Por consiguiente, se pretende que estas expresiones sean sinónimas entre sí, como se usan en este documento.

Cistatina A

Los Ejemplos demuestran la presencia de varios polimorfismos en la cistatina A, particularmente en la región promotora de la cistatina A. Por lo tanto, proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad de Grupo 1 y/o de Grupo II, mediante la detección de la presencia y/o ausencia de estos polimorfismos.

En los Ejemplos los inventores mostramos que la cistatina A se expresa de forma elevada en enfermedades con adhesión aumentada (por ejemplo, acné y psoriasis) y se regula hacia abajo en enfermedades con barrera cutánea defectuosa (por ejemplo, eccema). Por consiguiente, la actividad o nivel de cistatina A puede regularse hacia arriba como medio para tratar una enfermedad de Grupo I. El nivel o actividad de cistatina A puede regularse hacia abajo como medio para tratar una enfermedad de Grupo II.

Por lo tanto, los inventores divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo I o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo I (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, mediante detección de modulación, preferiblemente regulación hacia abajo de la expresión de cistatina A en un individuo.

Los inventores proporcionamos adicionalmente el diagnóstico de una enfermedad de Grupo II o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo II (preferiblemente eccema y/o psoriasis) en un individuo, mediante detección de modulación, preferiblemente regulación hacia arriba de la expresión de cistatina A en un individuo.

Los inventores proporcionamos el tratamiento o prevención de una enfermedad de Grupo I (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, mediante modulación, preferiblemente hacia arriba de la expresión de cistatina A en un individuo.

Los inventores proporcionamos adicionalmente el tratamiento o prevención de una enfermedad de Grupo II o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo II (preferiblemente eccema y/o psoriasis) en un individuo, mediante la modulación, preferiblemente regulación hacia abajo de la expresión de cistatina A en un individuo.

Polipéptidos

Los procedimientos y composiciones descritas en la presente proporcionan generalmente varios polipéptidos, junto con fragmentos, homólogos, variantes y derivados de los mismos. Los polipéptidos útiles adecuados incluyen proteínas de adhesión, proteasas o inhibidores de proteasa o fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos.

Por lo tanto, los inventores divulgamos variantes, homólogos o derivados de una secuencia de aminoácidos de proteínas de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa, así como variantes, homólogos o derivados de una secuencia de nucleótidos que codifican tales secuencias de aminoácidos. Cada uno de estos puede usarse para diagnosticar una enfermedad de Grupo I.

Los polipéptidos, variantes, homólogos, fragmentos y derivados divulgados en la presente pueden etiquetarse con una etiqueta reveladora. La etiqueta reveladora puede ser cualquier etiqueta adecuada que permite la detección de un polipéptido, etc. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos, por ejemplo, ¹²⁵I, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y enlazantes tales como biotina. Los polipéptidos etiquetados pueden usarse en procedimientos de diagnóstico tales como inmunoensayos para determinar la cantidad de un polipéptido en una muestra. Los polipéptidos o polipéptidos etiquetados también pueden usarse en inmunoensayos serológicos o mediados por células para la detección de reactividad inmune a tales polipéptidos en animales y humanos usando protocolos estándares.

Un polipéptido, variante, homólogo, fragmento o derivado divulgado en la presente, opcionalmente etiquetado, también puede fijarse a una fase sólida, por ejemplo la superficie de un pocillo o tira reactiva de inmunoensayo. Tales polipéptidos etiquetados y/o inmovilizados pueden envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones y similares adecuados. Tales polipéptidos y kits pueden usarse en procedimientos de detección de anticuerpos en los polipéptidos o sus variantes alélicas o de especie mediante inmunoensayo.

Los procedimientos de inmunoensayo se conocen bien en la técnica y comprenderán generalmente: (a) proporcionar un polipéptido que comprende un epítipo que puede unirse mediante un anticuerpo a dicha proteína; (b) incubar una muestra biológica con dicho polipéptido en condiciones que permiten la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (c) determinar si se forma el complejo anticuerpo-antígeno que comprende dicho polipéptido.

Fragmentos

También los inventores proporcionamos ácidos nucleicos y polipéptidos o péptidos que son fragmentos de los ácidos nucleicos y polipéptidos de proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa divulgados en la presente.

Preferiblemente tales fragmentos de ácidos nucleicos y polipéptidos comprenden, preferiblemente consisten en, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 4, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495 o 500 o más residuos de una secuencia relevante (es decir, cualquiera de las secuencias divulgadas en la presente). Preferiblemente, tales fragmentos comprenden actividad biológica, preferiblemente actividad de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa.

Un ácido nucleico para uso en los procedimientos y composiciones descritas en la presente puede comprender un vector de ADN o ARN viral o no viral, en donde los vectores no virales incluyen, a modo no taxativo, plásmidos, moléculas de ácido nucleico lineales, cromosomas artificiales, partículas condensadas y vectores episomales. Se ha observado la expresión de genes heterólogos después de inyección de ADN plasmídico en músculo (Wolff. *et al.*, 1990; Felgner *et al.*, 1996), tiroides (Sikes *et al.*, 1994), melanoma (Vile *et al.*, 1993), piel (Hengge *et al.*, 1995), hígado (Hickman *et al.*, 1994) y después de la exposición de epitelio de vías respiratorias (Meyer *et al.*, 1995).

Tal como se usa en la presente, se define que la expresión "ácido nucleico" abarca ADN y ARN o ambos de origen natural o sintético cuyo ADN o ARN puede contener desoxi- o didesoxi-nucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos modificados o no modificados. El ácido nucleico puede existir como ADN o ARN de cadena simple o cadena doble, un heterodúplex ARN/ADN o un copolímero ARNA/ADN, en donde el término "copolímero" se refiere a una cadena de ácido nucleico simple que comprende ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.

El término "sintético", tal como se usa en la presente, se define como lo que se produce mediante síntesis enzimática o química *in vitro*.

Ácidos nucleicos

Los procedimientos y composiciones descritas en la presente proporcionan generalmente varios ácidos nucleicos, junto con fragmentos, homólogos, variantes y derivados de los mismos. Los ácidos nucleicos útiles adecuados incluyen aquellos que codifican proteínas de adhesión, proteasas o inhibidores de proteasa o fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos.

Tal como se usan en el presente documento, se pretende que los términos "polinucleótido", "nucleótido" y ácido nucleico sean sinónimos entre sí. "Polinucleótido" generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. "Polinucleótidos" incluyen, a modo no taxativo, ADN de cadena simple o doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena simple o doble, ARN de cadena simple o doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple o doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o más típicamente de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena simple o doble. Adicionalmente, "polinucleótido" se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARNs que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARNs con esqueletos modificados por su estabilidad o por otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se han realizado diversas modificaciones a ADN y ARN; por lo tanto, "polinucleótido" abarca formas de polinucleótidos modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente con respecto a como se encuentran típicamente en forma natural, así como también las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. "Polinucleótido" también abarca polinucleótidos relativamente cortos, denominados a menudo oligonucleótidos.

Un experto en la técnica entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Adicionalmente, se entenderá que un experto en la técnica usando técnicas habituales puede hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia de polipéptidos codificada por los polinucleótidos descritos en la presente para reflejar la utilización de codones de cualquier organismo huésped específico en el que se van a expresar los polipéptidos.

También proporcionamos ácidos nucleicos que son fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los ácidos nucleicos relevantes (por ejemplo, una proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa que codifica ácido nucleico).

Variantes, derivados y homólogos

Variantes, fragmentos, derivados y homólogos de ácido nucleico pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser de cadena simple o cadena doble. También pueden ser polinucleótidos que incluyen nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos diferentes de modificaciones a oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. A efectos del presente documento, se entenderá que los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo para incrementar la actividad *in vivo* o el ciclo de vida de polinucleótidos de interés.

Cuando el polinucleótido es de cadena doble, los procedimientos y composiciones descritas en la presente abarcan ambas cadenas del dúplex, individualmente o en combinación. Cuando el polinucleótido es de cadena simple, se entenderá que la secuencia complementaria de dicho polinucleótido también se incluye.

Los términos "variante", "homólogo" o "derivado" relacionados con una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, supresión o adición de un ácido nucleico (o más) desde o hacia la secuencia. Preferiblemente dicha variante, homólogo o derivado codifica un polipéptido que tiene actividad biológica. Preferiblemente, tales fragmentos, homólogos, variantes y derivados de las proteínas de adhesión, proteasas e inhibidores de proteasa comprenden actividad enzimática modulada, por ejemplo, actividad de proteína de adhesión (por ejemplo, capacidad para permitir la adhesión entre dos células), actividad de proteasa o actividad de inhibidor de proteasa. Por lo tanto, proporcionamos por ejemplo fragmentos, homólogos, variantes y derivados de los polipéptidos relevantes que comprenden una actividad de proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa más baja en comparación con polipéptidos sin modificar. En particular, proporcionamos fragmentos, homólogos, variantes y derivados de proteínas de adhesión que exhiben actividad de adhesión reducida o incrementada. También se proporcionan fragmentos, homólogos, variantes y derivados de proteasas e inhibidores de proteasa que exhiben actividad de proteasa o inhibidor de proteasa reducida o incrementada.

Los ensayos de actividad de adhesión, actividad de proteasa y actividad de inhibidor de proteasa se conocen en la técnica.

Tal como se indicó anteriormente, con respecto a la identidad secuencial, un "homólogo" tiene preferiblemente al menos 5% de identidad, al menos 10% de identidad, al menos 15% de identidad, al menos 20% de identidad, al menos 25% de identidad, al menos 30% de identidad, al menos 35% de identidad, al menos 40% de identidad, al

5 menos 45% de identidad, al menos 50% de identidad, al menos 55% de identidad, al menos 60% de identidad, al menos 65% de identidad, al menos 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad o al menos 95% de identidad con respecto a la secuencia relevante que se muestra en los listados de secuencias. Por lo tanto, en particular, proporcionamos el uso de homólogos de proteínas de adhesión, proteasas e inhibidores de proteasa que tienen tal identidad en el tratamiento de enfermedades de Grupo I y Grupo II.

10 Más preferiblemente hay al menos 95% de identidad, más preferiblemente al menos 96% de identidad, más preferiblemente al menos 97% de identidad, más preferiblemente al menos 98% de identidad, más preferiblemente al menos 99% de identidad. Las comparaciones de identidad de nucleótidos pueden llevarse a cabo tal como se describió anteriormente. Un programa de comparación secuencial preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación predeterminada tiene un valor de concordancia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada discordancia. La penalización de la creación de intervalos predeterminada es -50 y la penalización de extensión de intervalos predeterminada es -3 para cada nucleótido.

Hibridación

15 Los inventores describimos adicionalmente secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse selectivamente con cualquiera de las secuencias indicadas en la presente, o cualquier variante, fragmento o derivado de las mismas o con el complemento de cualquiera de los mencionados anteriormente. Las secuencias de nucleótidos tienen preferiblemente al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 20, 30 o 50 nucleótidos de longitud.

20 El término "hibridación" tal como se usa en la presente incluirá "el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases" así como también el proceso de amplificación tal como se lleva a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa.

25 Los polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente con secuencias de nucleótidos indicadas en la presente, o con sus complementos, pueden ser al menos 40% homólogos, al menos 45% homólogos, al menos 50% homólogos, al menos 55% homólogos, al menos 60% homólogos, al menos 65% homólogos, al menos 70% homólogos, al menos 75% homólogos, al menos 80% homólogos, al menos 85% homólogos, al menos 90% homólogos o al menos 95% homólogos a las secuencias de nucleótidos correspondientes indicadas en la presente. Preferiblemente, tales polinucleótidos serán generalmente al menos 70%, preferiblemente al menos 80 o 90% y más preferiblemente al menos 95% o 98% homólogos a las secuencias de nucleótidos correspondientes indicadas en la presente sobre una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 o 30, por ejemplo al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos.

30 La expresión "hibridizable selectivamente" significa que el polinucleótido usado como sonda se usa en condiciones donde se descubrió que un polinucleótido objetivo se hibridiza con la sonda a un nivel considerablemente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede ocurrir debido a otros polinucleótidos presentes, por ejemplo, en la biblioteca de ADNc o ADN genómico que se está sometiendo a detección. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generado por la interacción entre la sonda y un miembro de ADN no específico de la biblioteca que es 10 veces, preferiblemente 100 veces menor en intensidad que la interacción específica observada en el ADN objetivo. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, mediante radioetiquetado de la sonda, por ejemplo con ³²P.

40 Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo de unión de ácido nucleico, como se describe en Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA) y confieren una "rigurosidad" definida tal como se explica a continuación.

45 La rigurosidad máxima típicamente ocurre a aproximadamente T_m-5°C (5°C por debajo de la T_m de la sonda); la rigurosidad alta a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de T_m; la rigurosidad intermedia a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de T_m; y la rigurosidad baja a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T_m. Tal como entenderá un experto en la técnica, una hibridación de rigurosidad máxima puede usarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas mientras una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja) puede usarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

50 En un aspecto preferido, proporcionamos secuencias de nucleótidos que se hibridizan con los ácidos nucleicos de la proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa, fragmentos, variantes, homólogos o derivados en condiciones de rigurosidad (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC {IxSSC = NaCl 0,15 M, Citrato de Na₃ 0,015 M, pH 7,0}).

Generación de homólogos, variantes y derivados

55 Los polinucleótidos que no son 100% idénticos a las secuencias de la presente divulgación pero que también se incluyen, así como homólogos, variantes y derivados de las proteínas de adhesión, proteasas e inhibidores de proteasa pueden obtenerse de diversas formas. Otras variantes de las secuencias pueden obtenerse por ejemplo mediante sondeo de bibliotecas de ADN hechas a partir de una variedad de individuos, por ejemplo individuos de

diferentes poblaciones. Por ejemplo, los homólogos pueden identificarse a partir de otros individuos u otras especies. Pueden producirse ácidos nucleicos y polipéptidos recombinantes adicionales identificando las posiciones correspondientes en los homólogos y sintetizando o produciendo la molécula tal como se describe en otras partes en el presente documento.

5 Además, pueden obtenerse otros homólogos virales/bacterianos o celulares de proteínas de adhesión, proteasas e inhibidores de proteasa, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos (por ejemplo, células de ratas, ratones, bovinos y primates) y tales homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridarse selectivamente con una proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa humano. Tales homólogos pueden usarse para diseñar ácidos nucleicos de proteína de adhesión, proteasa e inhibidor de proteasa, fragmentos, variantes y homólogos no humanos. La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante medios conocidos en la técnica para producir variedades adicionales.

10 La secuencias de homólogos pueden obtenerse sondeando bibliotecas de ADNc hechas a partir de o bibliotecas de ADN genómico a partir de otras especies animales y sondeando tales bibliotecas con sondas que comprenden todos o parte de los ácidos nucleicos de cualquier proteína de adhesión, proteasa o inhibidores de proteasa, fragmentos, variantes y homólogos u otros fragmentos en condiciones de rigurosidad media a alta.

15 Consideraciones similares se aplican para obtener homólogos de especie y variantes alélicas de los polipéptidos o secuencias de nucleótidos divulgadas en la presente.

20 Las variantes y homólogos de especie/cepa también pueden obtenerse usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para dirigir secuencias dentro de variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican proteínas de adhesión, proteasas o inhibidores de proteasa. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de diversas variantes/homólogos. Las alineaciones de secuencia pueden llevarse a cabo usando programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp se usa ampliamente.

25 Los cebadores usados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de rigurosidad más bajas que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simples con respecto a secuencias conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán que es probable que la homología de nucleótidos general entre secuencias de organismos relacionados vagamente sea muy baja y por lo tanto en estas situaciones la PCR degenerada puede ser el procedimiento preferido en lugar de someter a detección bibliotecas con fragmentos etiquetados de las secuencias.

30 Además, las secuencias homólogas pueden identificarse explorando bases de datos de nucleótidos y/o proteínas usando algoritmos de exploración tales como el conjunto de programas BLAST.

35 De forma alternativa, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis sitio-dirigida de secuencias caracterizadas, por ejemplo, ácidos nucleicos de proteína de adhesión, proteasa e inhibidor de proteasa o variantes, homólogos, derivados o fragmentos de los mismos. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se necesitan cambios codónicos silenciosos en las secuencias para optimizar las preferencias codónicas para una célula huésped específica en la que se expresan las secuencias de polinucleótidos. Pueden desearse otros cambios secuenciales para introducir sitios de reconocimiento de enzima de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

40 Los polinucleótidos descritos en la presente pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, etiquetada con un etiqueta reveladora mediante medios convencionales utilizando etiquetas radiactivas o no radiactivas, o pueden clonarse los polinucleótidos en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 8, 9, 10 o 45 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud y están abarcados también por el término "polinucleótidos" tal como se usa en la presente.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos y sondas de ADN pueden producirse recombinantemente, sintéticamente o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También puede clonarse mediante técnicas estándares.

50 En general, los cebadores se producirán mediante medios sintéticos que implican la fabricación gradual de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido a la vez. Las técnicas para lograrlo usando técnicas automatizadas están disponibles fácilmente en la técnica.

55 Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las mismas implicarán hacer un par de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) flanqueando una región de la secuencia de direccionamiento de lípidos que se desea clonar, poner en contacto los cebadores con ARNm o ADNc obtenidos de una célula animal o humano, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo, mediante

purificación de la mezcla de reacción en una gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzima de restricción de modo que el ADN amplificado puede clonarse en un vector de clonación adecuado.

5 Los polinucleótidos o cebadores pueden portar una etiqueta reveladora. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como ^{32}P o ^{35}S , etiquetas enzimáticas u otras etiquetas proteicas tales como biotina. Tales etiquetas pueden agregarse a polinucleótidos o cebadores y pueden detectarse usando técnicas conocidas de por sí. Los expertos en la técnica pueden usar polinucleótidos o cebadores o fragmentos de los mismos etiquetados o sin etiquetar en pruebas en base a ácido nucleico para detectar o secuenciar polinucleótidos en el cuerpo humano o animal.

10 Tales técnicas de detección comprenden generalmente poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN o ARN con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. Tal detección puede lograrse usando técnicas tales como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, eliminando el ácido nucleico en la muestra que no se hibridó con la sonda y luego detectar el ácido nucleico que se hibridó con la sonda. De
15 forma alternativa, puede inmovilizarse la muestra de ácido nucleico sobre un soporte sólido y puede detectarse la cantidad de sonda unida a dicho soporte. Los procedimientos de ensayo adecuados de este y otros formatos pueden encontrarse por ejemplo en WO89/03891 y WO90/13667.

Las pruebas para secuenciar nucleótidos implican poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN o ARN objetivo con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y determinar la secuencia mediante, por ejemplo, el procedimiento de terminación de cadena didesoxi Sanger (ver Sambrook *et al.*).

Tal procedimiento generalmente comprende alargar, en presencia de reactivos adecuados, el cebador mediante síntesis de una cadena complementaria al ADN o ARN objetivo y terminar selectivamente la reacción de
25 alargamiento en uno o más de los residuos A, C, G o T/U; permitiendo que ocurra el alargamiento de cadena y la reacción de terminación; apartando según el tamaño los productos alargados para determinar la secuencia de nucleótidos en la que ocurrió la terminación selectiva. Los reactivos adecuados incluyen una enzima polimerasa de ADN, los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, una solución amortiguadora y ATP. Los didesoxinucleótidos se usan para terminación selectiva.

Anticuerpos

30 Los inventores proporcionamos adicionalmente un anticuerpo, policlonal o monoclonal, que se une específicamente a epítopos en el polipéptido/proteína codificada por el gen de corneodesmosina o epítopos mutantes. En la preparación del anticuerpo, la proteína (con o sin mutaciones) codificada por el gen de corneodesmosina y los polimorfismos de la misma se usan como fuente del inmunógeno. Las secuencias de aminoácidos peptídicas aisladas a partir de la secuencia de aminoácidos o secuencias peptídicas mutantes
35 también pueden usarse como inmunógeno.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse sobre un péptido sintético en base a la secuencia o pueden prepararse recombinantemente mediante técnicas de clonación o el producto génico natural y/o porciones del mismo puede aislarse y usarse como
40 inmunógeno. Tales proteínas o péptidos pueden usarse para producir anticuerpos mediante tecnología de producción de anticuerpos estándar conocida por los expertos en la técnica tal como se describe en general en Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988.

45 Para producir anticuerpos policlonales se inmuniza un huésped tal como un conejo o cabra con la proteína o péptido, generalmente con un adyuvante y, si es necesario, se acopla a un portador; los anticuerpos para la proteína se recogen a partir de los sueros.

Para producir anticuerpos monoclonales la técnica implica la hiperinmunización de un donante apropiado, generalmente un ratón, con el fragmento de proteína o péptido y aislamiento de las células que producen el anticuerpo esplénico. Estas células están fusionadas a una célula que es inmortal, tal como una célula de
50 mieloma, para proporcionar un híbrido celular fusionado que es inmortal y secreta el anticuerpo requerido. Luego las células se cultivan a granel y los anticuerpos monoclonales se cosechan del medio de cultivo para su utilización.

El anticuerpo puede estar unido a un sustrato de soporte sólido o conjugado con un resto detectable o puede estar unido y conjugado tal como se conoce bien en la técnica. (Para una descripción general de la conjugación de
55 restos fluorescentes o enzimáticos ver Johnstone and Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.) La unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido se conoce bien en la técnica. (Para una descripción general ver Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, Nueva York, 1988). Los restos detectables pueden incluir, a modo no taxativo,

marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radioactivos tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina tritio, ^{14}C y yodación.

Análisis de desequilibrio de ligamiento

5 El análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) es una herramienta importante para mapear genes de enfermedades y puede ser particularmente útil para investigar rasgos complejos. El mapeo por LD se basa en las siguientes expectativas: para cualesquiera dos miembros de una población se espera que los sucesos de recombinación que ocurren durante varias generaciones hayan cambiado sus genomas, de modo que tienen poco en común con sus antepasados. Sin embargo, si estos individuos están afectados por una enfermedad heredada de un antepasado común, el gen responsable por la enfermedad y los marcadores que lo rodean directamente probablemente se heredarán sin cambio o IBD ("idéntico por descendencia"), desde dicho antepasado. El tamaño de las regiones que permanecen compartidas (es decir, IBD) es inversamente proporcional a la cantidad de generaciones que separan a los individuos afectados y su antepasado común. Por lo tanto, las poblaciones "viejas" son adecuadas para mapeo de escala pequeña y las fundadas recientemente son apropiadas para utilización con LD para localizar de forma aproximada genes de enfermedades. (Houwen et al., 1994, en particular la FIG. 3 y el texto adjunto). Debido a que las poblaciones aisladas típicamente tuvieron una pequeña cantidad de fundadores, son particularmente adecuadas para enfoques de LD, tal como lo indican varios estudios de LD exitosos en Finlandia (de la Chapelle, 1993).

20 El análisis por LD se ha utilizado en varios esfuerzos de clonación posicional (Kerem et al., 1989; MacDonald et al., 1992; Petrukhin et al., 1993; Hastbacka et al., 1992 and 1994), pero en cada caso la localización inicial se logró usando procedimientos de ligamiento convencionales. La clonación posicional es el aislamiento de un gen únicamente en función de su ubicación cromosómica, sin considerar su función bioquímica. Lander y Botstein (1986) propuso que el mapeo por LD podría usarse para someter a detección el genoma humano para loci de enfermedades, sin análisis de ligamiento convencionales. Este enfoque no fue aplicable hasta que surgió un conjunto de marcadores mapeados que cubrían el genoma (Weissenbach et al., 1992). Los solicitantes demuestran ahora la viabilidad de la detección del genoma usando mapeo por LD.

La identificación de la ubicación cromosómica de un gen responsable por provocar una enfermedad asociada con la adhesión célula-célula aumentada o reducida en el epitelio puede facilitar el diagnóstico, tratamiento y asesoramiento genético de individuos en familias afectadas.

30 Debido a la gravedad del trastorno y las limitaciones de un diagnóstico puramente fenotípico de tales enfermedades, existe una necesidad enorme de subtipificar genéticamente a individuos para confirmar los diagnósticos clínicos y para determinar las terapias apropiadas en base a sus subtipos genotípicos.

Diagnóstico de enfermedades

35 Proporcionamos procedimientos para diagnosticar enfermedades asociadas con la adhesión célula-célula epitelial anormal. Se ha demostrado que las mutaciones en genes que codifican proteínas de adhesión (por ejemplo, corneodesmosina) resultan en adhesión reducida entre células epiteliales tales como corneocitos. Algunas mutaciones en estos genes pueden resultar en la expresión alterada (típicamente reducida) de proteínas de adhesión o en la expresión de proteínas de adhesión que tienen actividad de adhesión reducida o sensibilidad a proteasa más alta. Otras mutaciones en genes de proteasa e inhibidor de proteasa también se asocian con enfermedades, tal como se muestra en los Ejemplos. Tales mutaciones se asocian típicamente y pueden conducir a enfermedades de Grupo I, ya que la adhesión célula-célula reducida resulta en función de barrera alterada de la epidermis.

45 Por consiguiente, una enfermedad de Grupo 1 puede diagnosticarse en un paciente que padece o es probable que padezca la enfermedad determinando el nivel de expresión de una proteína de expresión, donde un nivel de expresión reducido de una proteína de adhesión es diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1. Adicionalmente, proporcionamos un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 determinando la actividad de adhesión de una proteína de adhesión implicada en la adhesión célula-célula epitelial, donde una actividad de adhesión reducida es diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1. Proporcionamos adicionalmente un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 determinando la sensibilidad a proteasa de una proteína de adhesión implicada en la adhesión célula-célula epitelial, donde una sensibilidad a proteasa aumentada es diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1. También describimos un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1, determinando la presencia de una mutación que se asocia con una expresión reducida de una proteína de adhesión o con la expresión de una proteína de adhesión con actividad de adhesión reducida y/o sensibilidad a proteasa aumentada.

55 De acuerdo con una realización preferida, el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 se lleva a cabo mediante detección de ausencia de un sitio de enzima de restricción *HphI* en el gen de corneodesmosina.

Preferiblemente, la enfermedad de Grupo 1 diagnosticada mediante la ausencia de un sitio *HphI* es eccema o enfermedad de Crohn.

De forma alternativa o conjuntamente, proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 mediante detección de la presencia de una T en la posición +1243 en el gen de corneodesmosina. Preferiblemente, la enfermedad de Grupo 1 diagnosticada mediante la presencia de una T en la posición +1243 es eccema o enfermedad de Crohn.

5 Preferiblemente, la presencia de T en la posición +1243 se asocia con una transición C a T.

Cualquier procedimiento para determinar la sensibilidad a proteasa de una proteína tal como se conoce en la técnica (Egelrud, 1993) puede usarse en los procedimientos de diagnóstico presentados anteriormente. De forma similar, la detección de mutaciones por medio de, por ejemplo, análisis SSCP, RFLP, SNP, etc., se conoce en la técnica y se describe en más detalle a continuación.

10 La detección de degradación proteolítica anormal (es decir, aumentada) de una proteína de adhesión también puede utilizarse para diagnosticar enfermedades de Grupo 1. Por lo tanto, un nivel aumentado de expresión y/o actividad de una proteasa implicada en la proteólisis de una proteína de adhesión es característico (y por tanto diagnóstico) de una enfermedad de Grupo 1. Por consiguiente, proporcionamos un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 mediante la detección del nivel de expresión de una proteasa implicada en la
15 proteólisis de una proteína de adhesión. Proporcionamos adicionalmente un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 mediante la detección del nivel de actividad de una proteasa implicada en la proteólisis de una proteína de adhesión, donde un nivel de actividad de proteasa aumentado es diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1.

20 El nivel de expresión y/o actividad de un inhibidor de proteasa que es capaz de inhibir la actividad proteolítica de una proteasa implicada en la degradación de una proteína de adhesión también puede detectarse como medio de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 2. Por consiguiente, un nivel disminuido de expresión y/o actividad de un inhibidor de proteasa es característico de una enfermedad de Grupo 1. Por lo tanto, un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 comprende detectar un nivel de expresión disminuido de un inhibidor de proteasa en un paciente. De forma similar, un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1
25 también puede comprender detectar el nivel de actividad de un inhibidor de proteasa, donde un nivel de actividad disminuido de un inhibidor de proteasa es diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1.

Es evidente que la detección de la expresión y/o actividad de proteasas y/o inhibidores de proteasa también puede llevarse a cabo a nivel genético, es decir, detectando mutaciones asociadas con actividad de proteasa/inhibidor de proteasa aumentada o disminuida.

30 Preferiblemente, la proteína de adhesión que se detecta o cuyas propiedades se determinan en los procedimientos mencionados anteriormente es corneodesmosina y, preferiblemente, el gen es un gen que codifica corneodesmosina. Preferiblemente, la proteasa que se detecta, etc., es enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) o enzima triptica del estrato córneo (SCTE).

35 Preferiblemente, el inhibidor de proteasa que se detecta, etc., es antileucoproteasa (SLPI) o inhibidor de proteasa 3 elafina (PI3 o SKALP).

Preferiblemente, el inhibidor de proteasa que se detecta, etc., es elafina. Cuando se usan las expresiones "más alta", "aumentada" e "incrementada" en referencia a actividad, sensibilidad a proteasa, expresión, etc., se entenderá que éstas son relativas a las propiedades correspondientes de un epitelio normal, sano del mismo paciente u otro individuo. De forma similar, las expresiones "más baja", "disminuida" y "reducida" se refieren a un nivel relativo a un epitelio normal, sano.
40

Ejemplos específicos no taxativos de procedimientos de diagnóstico adecuados para los procedimientos y composiciones descritas en la presente se indican a continuación:

45 Pueden llevarse a cabo pruebas de diagnóstico genéticas genotipificando genes que codifican proteínas corneodesmosomales (por ejemplo, corneodesmosoma), proteasas (SCCE, SCTE) e inhibidores de proteasa (es decir, SKALP, SLPI) para SNPs asociados con enfermedades de interés. Los cebadores diseñados corresponden a secuencias que flanquean mutaciones y/o polimorfismos. Las secuencias de los genes de proteasas (SCCE, SCTE) e inhibidores de proteasa (es decir, SKALP, SLPI), por ejemplo, pueden utilizarse para diseñar cebadores en las extremidades de cada exón usando el programa informático Gene Jockey II (Biosoft, 49 Bateman Street, Cambridge CB2 1LR). Después de la amplificación por PCR, la mutación puede detectarse mediante
50 discriminación alélica utilizando enzimas de restricción, análisis TaqMan (tal como se describe más adelante) o simplemente mediante secuenciación.

Brevemente, las reacciones de PCR de 25µl comprendían 8% de glicerol, 200 µM de cada dATP, dGTP y dCTP, 400 µM de dUTP, 1,25 U AmplitaqGold (Perkin-Elmer, EE.UU.), 1,25 U Uracil-N-Glicosilasa (Perkin-Elmer, EE.UU.), 5mM MgCl₂, 500-900 nM en cada cebador. La discriminación alélica en estos loci se lleva a cabo utilizando un ensayo de nucleasa 5' (prueba de discriminación alélica TaqMan™), un procedimiento validado ampliamente. Esta prueba se basa en la actividad de nucleasa 5' de polimerasa Taq y en la detección mediante transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) de la escisión de dos sondas diseñadas para
55

5 hibridarse con cualquier alelo durante la PCR. Las sondas fluorescentes dobles se obtienen de ABI-PE (Forster City, CA; Warrington, RU). Se diseñan las secuencias de sonda y cebador y las sondas se etiquetan con tintes fluorescentes de carboxifluoresceína (FAM) y carboxi-4,7,2' 7'-tetraclorofluo-resceína (TET) en el extremo 5' y con el apacador carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo terminal 3'. Las concentraciones de las sondas de FAM y TET variaron entre 20-50 nM y 50-350 nM respectivamente, dependiendo de las sondas utilizadas. Las placas se someten a detección en un fluorímetro LS50-B o PE7200 (ABI/Perkin-Elmer).

10 Tal como se usa en la presente la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere al procedimiento de PCR descrito en las patentes de Mullis, et al., Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.683.195 y 4.683.202. El procedimiento básicamente implica: (1) tratar el ADN extraído para formar cadenas complementarias de cadena simple; (2) agregar un par de cebadores de oligonucleótidos, en donde un cebador del par es sustancialmente complementario a parte de la secuencia en la cadena homsentido y el otro cebador de cada par es sustancialmente complementario a una parte diferente de la misma secuencia en la cadena antisentido complementaria; (3) aparear los cebadores emparejados con la secuencia complementaria; (4) extender simultáneamente los cebadores apareados desde un extremo terminal 3' de cada cebador para sintetizar un producto de extensión complementario a las cadenas apareadas a cada cebador en donde dichos productos de extensión después de la separación del complemento sirven como plantillas para la síntesis de un producto de extensión para el otro cebador de cada par; (5) separar dichos productos de extensión de dichas plantillas para producir moléculas de cadena simple; y (6) amplificar dichas moléculas de cadena simple repitiendo al menos una vez dichas etapas de apareamiento, extensión y separación.

20 Las pruebas de diagnóstico bioquímicas incluyen perfiles de proteólisis, detección de los extremos terminales N/C, detección de función y/o actividad enzimática.

25 Los perfiles de proteólisis pueden llevarse a cabo como se indica a continuación. Se generan anticuerpos policlonales capaces de reconocer las formas completas y maduras de corneodesmosina. El extracto de estrato córneo puede extraerse a partir de tiras obtenidas de pacientes. Los extractos proteicos se pasan por gel de SDS-PAGE, se transfieren a una membrana y se hibridizan con anticuerpo anticorneodesmosina primario y anticuerpo secundario etiquetado. El peso molecular de la corneodesmosina procesada de pacientes se compara con el de los controles.

30 La detección de los extremos terminales N-/C puede llevarse a cabo como se indica a continuación. En caso de presencia de formas particulares de proteínas desmosomales/corneodesmosomales (por ejemplo, corneodesmosina) en un grupo de pacientes pero no en los controles o viceversa, pueden producirse anticuerpos específicos de los extremos terminales N-/C para detectar la formas patógenas de proteínas desmosomales/corneodesmosomales (por ejemplo, corneodesmosina). La identificación de las formas patógenas puede llevarse a cabo como se indica más adelante. Se purifican formas diferentes de corneodesmosina a partir de extracto de solución amortiguadora hipotónica no desnaturalizada (extracto de solución amortiguadora TEA) de epidermis humana mediante intercambio aniónico y cromatografía de afinidad (Simon et al, 1997). Las fracciones eluidas de la columna de afinidad se reúnen, liofilizan y separan mediante SDS-PAGE. Las bandas correspondientes a las formas de patogénesis de corneodesmosina se eliminan y caracterizan mediante análisis de secuencia de aminoácidos interna y de extremo terminal NH₂.

La detección de la actividad/función enzimática puede llevarse a cabo como se indica más adelante.

40 Las proteínas desmosomales/corneodesmosomales (por ejemplo, corneodesmosina) se radioetiquetan durante la traducción *in vitro* de ADNc y se incuban con enzimas de proteasa (SCCE, SCTE) a 37°C durante 1,5-3 h. SCCE y SCTE pueden prepararse usando extracto KC 1 de corneocitos plantares disociados tal como describe Egelrud, 1993 y Brattsand and Egelrud, 1999 (Egelrud, 1993; Brattsand and Egelrud, 1999). SCCE puede purificarse mediante cromatografía de afinidad en SBTI Affigel 15. Un procedimiento alternativo es producir una proteína de fusión *in vitro* y purificarla utilizando columnas de inmunoafinidad (Ekholm et al, 2000). Se utilizan SDS-PAGE y autorradiografía para analizar el patrón de péptidos hidrolíticos. La intensidad de las bandas de autorradiografía se cuantifica mediante densitometría y se calcula la fracción de péptidos menor a 56 kDa (longitud completa). La actividad se expresa como sustrato molar procesado por enzima g por segundo.

Desmosomas y corneodesmosomas

50 Los desmosomas son estructuras simétricas que forman uniones intercelulares en forma de disco entre células epiteliales. En la epidermis los desmosomas median la adhesión entre queratinocitos. En la psoriasis, varias ictiosis y xerosis cutánea, la cantidad de corneodesmosomas (desmosomas en capas superiores de la epidermis) aumenta en el estrato córneo. La microscopía inmunoelectrónica se ha utilizado para mostrar las interacciones definidas dentro de corneodesmosomas entre proteínas del dominio central extracelular tales como desmogleína y desmocollinas y proteínas corneodesmosomales intracelulares incluyendo desmoplaquinas I y II, placoglobina (PG) y placofilinas (PP) (Cowin and Burke, 1996). La importancia de las proteínas corneodesmosomales en la integridad epidérmica se demuestra por trastornos heredados tales como queratodermia palmoplantar de subtipo estriada provocada por haploinsuficiencia de desmoplaquina (Armstrong et al, 1999). Las mutaciones en el gen lorricrina conducen a queratodermia de Camisa. La corneodesmosina es una glicoproteína de los

corneodesmosomas. Se aislaron tres formas de corneodesmosina con diferentes pesos, 33-36 a 40-46 y 52-56 kDa, de la epidermis (Simon et al, 1997).

5 Las mutaciones dentro del gen de corneodesmosina/S y genes relacionados dentro del grupo de genes epidérmicos MHC (cromosoma 6p21) resultan en cohesión reducida entre corneocitos.

Diagnóstico genético

10 Los inventores divulgamos un procedimiento para diagnosticar y detectar portadores de un gen de proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa defectuoso responsable por provocar enfermedades de Grupo 1 o Grupo 2 o asociado con la regulación anormal de la proteólisis de una proteína de adhesión tal como corneodesmosina.

15 Los inventores proporcionamos adicionalmente procedimientos para detectar copias normales del gen y su producto génico. La identificación de los portadores por sus genes defectuosos o por su proteína/s ausente/s o defectuosa/s codificada/s por los mismos, conduce al diagnóstico más temprano y más consistente de los portadores génicos. Por lo tanto, dado que los portadores de la enfermedad tienen más probabilidades de ser propensos a las enfermedades de Grupo 1 o Grupo 2, pueden iniciarse una vigilancia mejor y protocolos de tratamiento para los mismos.

20 Brevemente, los procedimientos comprenden las etapas de obtener una muestra de un sujeto de prueba, aislar el material de prueba apropiado a partir de la muestra y ensayar para la secuencia de ácido nucleico o producto génico objetivo. La muestra puede ser tejido o fluidos corporales de los que se aíslan material genético y/o proteínas usando procedimientos estándares en la técnica. Por ejemplo, puede aislarse ADN a partir de sangre.

25 Más específicamente, el procedimiento de detección del portador se lleva a cabo obteniendo primero una muestra de células o fluido corporal de un sujeto. Los procedimientos convenientes para obtener una muestra celular pueden incluir recolección de fluidos de limpieza bucal o bulbos pilosos. Una muestra celular podría ser células o tejido amniótico o placentario en el caso de un diagnóstico prenatal. Un ADN bruto podría hacerse a partir de células (o de forma alternativa proteínas aisladas) mediante técnicas conocidas en la técnica. Este ADN objetivo aislado a continuación se utiliza para análisis por PCR (o de forma alternativa, análisis de transferencia Western) con cebadores apropiados derivados de la secuencia génica mediante técnicas conocidas en la técnica. El producto de PCR a continuación se probaría para la presencia de las variaciones secuenciales apropiadas para evaluar el estatus de enfermedad genotípica del sujeto.

30 El espécimen puede someterse a ensayo para polipéptidos/proteínas mediante tinción inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (ver en general Stites and Terr, Basic and Clinical Immunology, Appleton and Lange, 1994), ELISA, RIA, inmunotransferencias, transferencias Western, inmunoprecipitación, ensayos funcionales y prueba de truncamiento proteico. En realizaciones preferidas se usan transferencia Western, ensayos funcionales y prueba de truncamiento proteico (Hogervorst et al., 1995). El ARNm complementario a la secuencia de ácido nucleico objetivo puede someterse a ensayo mediante hibridación in situ, transferencia Northern y reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa. Las secuencias de ácido nucleico pueden identificarse mediante hibridación in situ, transferencia Southern, polimorfismo conformacional de cadena simple, amplificación PCR y análisis de chip de ADN usando cebadores específicos. (Kawasaki, 1990; Sambrook, 1992; Lichter et al, 1990; Orita et al, 1989; Fodor et al., 1993; Pease et al., 1994)

40 Los ensayos ELISA son conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos policlonales y monoclonales pueden utilizarse en los ensayos. Otros inmunoensayos apropiados tales como radioinmunoensayos (RIA) pueden utilizarse como se conocen en la técnica. Los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura de patentes y científica. Ver, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521 así como también Sambrook et al, 1992.

45 Los datos de mutación actuales tales como se describen en la presente indican que las enfermedades de Grupo 1 se caracterizan por heterogeneidad alélica. Por lo tanto, es importante para una detección de mutación exitosa poder detectar todas las alteraciones de nucleótidos posibles en el gen de corneodesmosina u otra proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa, más que enfocarse en un subconjunto limitado. Los procedimientos que incluyen secuenciación directa de hibridación de ADN o ARN o chip de ADN amplificada por PCR (Fodor et al., 1993; Pease et al., 1994) pueden aplicarse junto con otros procedimientos adecuados conocidos en la técnica.

50 Para utilizar los procedimientos para aplicaciones de diagnóstico, es ventajoso incluir un mecanismo para identificar la presencia o ausencia de secuencias de polinucleótidos objetivo (o proteínas alternativas). En muchos procedimientos experimentales o de diagnóstico en base a hibridación, se usa una etiqueta o rótulo para detectar o visualizar la presencia o ausencia de una secuencia de polinucleótidos en particular. Típicamente, las sondas de oligómeros se etiquetan con radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S (Sambrook, 1992) que pueden detectarse mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como autorradiografía. Las sondas de oligómeros también pueden etiquetarse mediante procedimientos no radiactivos tales como materiales quimioluminescentes que

pueden detectarse mediante autorradiografía (Sambrook, 1992). También pueden usarse procedimientos de detección y etiquetado en base a sustrato enzimático. El etiquetado puede llevarse a cabo mediante mecanismos conocidos en la técnica tales como etiquetado de extremos (Sambrook, 1992), etiquetado químico o mediante hibridación con otro oligonucleótidos etiquetado. Estos procedimientos de etiquetado y detección se proporcionan meramente como ejemplos y no se pretende proporcionar una lista completa y exhaustiva de todos los procedimientos conocidos en la técnica.

La introducción de una etiqueta a efectos de detección puede llevarse a cabo ligando la etiqueta a la sonda antes de la hibridación.

Un procedimiento alternativo incluye la etapa de unir el ADN objetivo a un soporte sólido antes de la aplicación de la sonda. El soporte sólido puede ser cualquier material capaz de unirse al ADN objetivo, tales como perlas o un material membranoso tales como nitrocelulosa o nylon. Luego que el ADN objetivo se une al soporte sólido se aplican los oligómeros de la sonda.

Los ensayos funcionales pueden usarse para detección de individuos portadores o afectados del Grupo 1.

También los inventores proporcionamos un kit para el diagnóstico y detección de un gen de corneodesmosina defectuoso. El kit incluye una sonda molecular complementaria a las secuencias genéticas de un gen de corneodesmosina defectuoso que provoca una enfermedad de Grupo 1 y etiquetas adecuadas para detectar la hibridación de la sonda molecular y el gen defectuoso indicando de este modo la presencia del gen defectuoso. La sonda molecular tiene una secuencia de ADN complementaria a las secuencias mutantes. De forma alternativa, el kit puede contener reactivos y anticuerpos para la detección de proteínas mutantes.

También se proporciona un kit para detección y diagnóstico de un gen de proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa defectuoso que comprende una sonda molecular complementaria a las secuencias genéticas de un gen de proteína de adhesión, proteasa o inhibidor de proteasa defectuoso que provoca una enfermedad de Grupo 1 y etiquetas adecuadas para detectar la hibridación de la sonda molecular y el gen defectuoso indicando de este modo la presencia del gen defectuoso. La sonda molecular tiene una secuencia de ADN complementaria a las secuencias mutantes. De forma alternativa, el kit puede contener reactivos y anticuerpos para la detección de proteínas mutantes.

Algunos procedimientos diferentes se usan comúnmente para analizar el ADN para polimorfismos o mutaciones. El procedimiento más definitivo es secuenciar el ADN para determinar la secuencia de base real (Maxam and Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977). Aunque tal procedimiento es el más definitivo también es el procedimiento más costoso y que requiere más tiempo.

El análisis de mapeo de restricción también puede usarse para analizar ADN para polimorfismos. Si se está buscando un polimorfismo conocido en un sitio de restricción que cambiará el sitio de restricción por una enzima de restricción es posible digerir simplemente ADN con esta enzima de restricción y analizar los fragmentos sobre un gel o con una transferencia Southern para determinar la presencia o ausencia del polimorfismo. Este tipo de análisis también es útil para determinar la presencia o ausencia de macro inserciones o deleciones. La hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo es otro procedimiento para determinar la presencia de polimorfismos conocidos.

Por lo tanto, secuencias de ADN específicas en un individuo, por ejemplo, un gen que codifica corneodesmosina pueden sufrir muchos cambios diferentes, tales como deleción de una secuencia de ADN, inserción de una secuencia que se duplicó, inversión de una secuencia o conversión de un nucleótido simple en otro. Los cambios en una secuencia de ADN específica pueden trazarse usando enzimas de restricción que reconocen secuencias de ADN específicas de 4-6 nucleótidos. Las enzimas de restricción cortan (digieren) el ADN en su secuencia específica reconocida, resultando en alrededor de un millón de partes. Cuando existe una diferencia que cambia una secuencia reconocida por una enzima de restricción en una no reconocida, la parte de ADN producida cortando la región es de un tamaño diferente. Los diversos tamaños de fragmento posibles a partir de una región dada dependen por lo tanto de la secuencia de ADN exacta en la región. La variación en los fragmentos producidos se denomina "polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción" (RFLP). Los fragmentos de diferentes tamaños que reflejan diferentes variantes de secuencias de ADN pueden visualizarse separando el ADN digerido de acuerdo con su tamaño sobre gel de agarosa y visualizando los fragmentos individuales apareándolos a una "sonda" de ADN etiquetada radiactivamente. Cada individuo puede portar dos formas diferentes de la secuencia específica. Cuando los dos homólogos portan la misma forma del polimorfismo se observa una banda. Pueden existir más de dos formas de un polimorfismo para un marcador de ADN específico en la población, pero en una familia solo son posibles cuatro formas, dos de cada padre. Cada niño hereda una forma del polimorfismo de cada padre. Por consiguiente, el origen de cada región cromosómica puede trazarse (origen maternal o paternal).

Adicionalmente, la RT-PCR puede llevarse a cabo con posterior análisis de huella genética con endonucleasa de restricción (REF). El REF es una modificación del procedimiento de polimorfismo conformacional de cadena

simple (SSCP) y permite la detección eficiente de alteraciones secuenciales en fragmentos de ADN hasta 2 kb de longitud (Liu and Sommer, 1995).

La utilización de espectrometría de masas para determinar la presencia de polimorfismos dentro de genes conocidos se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 5.869.242.

5 El análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) es un procedimiento rápido y eficaz para detectar polimorfismos (Dean et al., 1990; Glavac and Dean, 1993; Poduslo *et al.*, 1991). En SSCP, la motilidad de cadena anormal sobre un gel se asocia con sucesos mutacionales en el gen.

10 El análisis genético de polimorfismos se describe en detalle en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.552.28, 5.654.13, 5.670.33, 5.807.67, 5.858.66, 5.691.15, 5.922.57, 5.972.60, 6.36.53 y 5.955.26, entre otras.

Cualquiera de estos procedimientos descritos en las referencias anteriores puede usarse en los procedimientos de diagnóstico descritos en la presente.

Ejemplos

Ejemplos A: polimorfismos de proteína de adhesión

15 Ejemplo A1. Identificación de polimorfismos del gen de corneodesmosina (S)

Se extrae ADN genómico de sangre completa de acuerdo con protocolos estándares y se almacena a 100 ng/μl. Se analiza un polimorfismo exónico reportado que proporciona una transición T a C en la posición +1243 (Ishihara *et al.*, 1996, Tazi-Ahnni *et al.*, 1999a, 1999b).

20 Se usan los cebadores S 15 (5'CATTGCATTCCAGCCAGTGG3') y S 16 (5'AACTGGAGCTGCTGCTGAAGGA3') para amplificar el locus del polimorfismo (+1243). Las PCRs se preparan a granel y se reparten en alícuotas hasta volúmenes de 25 μl que comprenden 50 mM de KCL, 20 mM de Tris-HCL, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 1,2 M de cada cebador, 1 U de polimerasa *Taq* (Gibco BRL, Paisley, RU) y 200 ng de ADN genómico. Las condiciones de termociclado son 2 min a 95°C, 28 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C y 15 s a 72°C. Las amplificaciones finalizan con 15 min a 72°C.

25 Las digestiones de restricción se llevan a cabo en reacciones de 20 μl que contienen 10 μl de productos de PCR y 2,5 U de *HphI* y solución amortiguadora apropiada del fabricante (New England Biolabs, Hitchin, RU) a 37°C durante toda la noche. La discriminación alélica se lleva a cabo mediante electroforesis usando 2% de agarosa. La digestión *HphI* produce 123 + 89 bp de alelo 1, mientras no corta el alelo 2 (212 bp).

Alelos

30 En los siguientes Ejemplos, "alelo 1" se refiere a un alelo en el que el residuo de nucleótidos en la posición + 1243 es C. La proteína codificada por dicho alelo tiene un residuo de serina (S) en la posición 394 de la secuencia de aminoácidos que emplea la numeración de la secuencia de polipéptidos que tiene el número de acceso L20815.

35 De forma similar, "alelo 2" se refiere a un alelo en el que el residuo de nucleótidos en la posición +1243 es T. La proteína codificada por dicho alelo tiene un residuo de leucina en la posición 394 de la secuencia de aminoácidos que emplea la numeración de la secuencia de polipéptidos que tiene el número de acceso L20815.

40 La numeración de la posición de aminoácido se refiere al codón de inicio de traducción (+1, ATG) de la secuencia de corneodesmosina con los números de acceso de GenBank GB: L20815 o AF030130, tal como se indicó. Por tanto, por ejemplo, una sustitución C a T en +1243 proporciona un cambio de aminoácidos de S a F en la posición 394 de acuerdo con la secuencia GB L20815, mientras las misma sustitución de nucleótidos proporciona cambios de aminoácidos de S a F en la posición 410 de acuerdo con la secuencia GB AF030130.

Análisis estadístico

45 Las poblaciones enfermas y control se comparan usando tablas de 2x3 y la cociente de probabilidades se calcula comparando individuos homocigóticos para el alelo 1 con el que porta el alelo alternativo (alelo 2) en la población control y de pacientes. La prueba $A\chi^2$ para el alelo 2 también se lleva a cabo, ponderada por la cantidad de alelos de susceptibilidad a enfermedad putativa en cada grupo genotípico.

Ejemplo A2. Asociación de polimorfismos en +1243 del gen de corneodesmosina (S) con eccema atópico

En este Ejemplo, a menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácidos en la secuencia de corneodesmosina se proporcionan en referencia a la numeración en la secuencia de GenBank L20815.

50 Este Ejemplo demuestra que el alelo 2 de corneodesmosina, en el que el residuo de nucleótidos de corneodesmosina en la posición +1243 es T, que conduce a la presencia de un residuo de leucina (T) en la posición 394 del polipéptido de corneodesmosina (L20815), está asociado con eccema atópico.

La distribución alélica del polimorfismo en + 1243 se evalúa en los grupos de eccema atópico y controles (n=154 y 550, respectivamente), tal como se describió anteriormente.

Los controles y pacientes están ambos en equilibrio de Hardy Weinberg.

5 La Tabla A2.1 muestra los valores observados (A) y esperados (B) de cada genotipo en los grupos de controles y de pacientes con eccema atópico.

Tabla A2.1: Distribución alélica de 11, 12 y 22 en grupos control y de pacientes con eccema atópico. A: Valores observados; B: Valores esperados

(A) Valores observados			
	22 (T/T)	12 (T/C)	11 (C/C)
Controles	150	284	116
Pacientes	52	74	28
(B) Valores esperados			
	22 (T/T)	12 (T/C)	11 (C/C)
Controles	157,8	279,7	112,5
Pacientes	44,2	78,3	31,5

10 La diferencia general entre los valores esperados y observados en los controles y pacientes no es estadísticamente considerable. Sin embargo, existe un aumento del alelo poco común (alelo 2, 52/44,2=1,2). El alelo 1 (alelo común) parece ser protector del eccema y por este motivo agrupamos a los individuos con alelos 12 y 11 en un subgrupo y 22 en otro (ver Tabla A2.2 a continuación).

Tabla A2.2: Distribución alélica de alelo 11 y 12/22 en grupos control y de pacientes con eccema atópico.

	22 (TT)	11/12 (CC/CT)
Pacientes	52	102

15 Se llevó a cabo la prueba A χ^2 para alelo 2 con respecto a portador de alelo 1. Se encontró una asociación importante entre el alelo 2 del polimorfismo del gen de corneodesmosina (+1243) y el eccema atópico [OR = 1,36 (0,93,1,99)].

20 Por consiguiente divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de una T en la posición + 1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina o la presencia de un residuo de leucina (L) en la posición 394 de un polipéptido de corneodesmosina (L20815), o ambos, de un individuo.

Ejemplo A3. Asociación de polimorfismos en +1243 del gen de corneodesmosina (S) con dermatitis

25 En este Ejemplo, a menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácidos en la secuencia de corneodesmosina se proporcionan en referencia a la numeración en la secuencia de GenBank L20815.

Este Ejemplo demuestra que el alelo 2 de corneodesmosina, en el que el residuo de nucleótidos de corneodesmosina en la posición +1243 es una T, que conduce a la presencia de un residuo de leucina (L) en la posición 394 del polipéptido de corneodesmosina (L20815), está asociado con dermatitis y puede ser la causa de la patogenia de dermatitis herpetiforme.

30 La distribución alélica del polimorfismo en + +1243 se evalúa en los grupos de dermatitis herpetiforme y controles (n=50 y 550, respectivamente), tal como se describió anteriormente. Los controles y pacientes están ambos en equilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla A3.1: Distribución alélica de los alelos 11, 12 y 22 en grupos control y de dermatitis herpetiforme

A) Valores observados			
	22 (T/T)	12 (T/C)	11 (C/C)
Controles	150	284	116
Pacientes	26	23	1
B) Valores esperados			
	22 (T/T)	12 (T/C)	11 (C/C)
Controles	161,3	281, 4	107,2
Pacientes	14, 6	25,5	9, 7

Existe un aumento del alelo poco común (alelo 2,26/14,6=1,78). Solo un paciente es homocigoto para el alelo 1 (un alelo común). Este alelo parece ser protector ya que es muy frecuente en la población control.

Tabla A3.2: Distribución alélica de los alelos 11 y 12/22 en grupos control y de dermatitis herpetiforme

	TT/CT (22/12)	CC (12/11)
Controles	434	116
Pacientes	49	1

5

Se llevó a cabo la prueba $A\chi^2$ para alelo 1 con respecto a portador de alelo 2. Se encontró una asociación importante entre el alelo 2 del polimorfismo del gen S (+1243) y la dermatitis herpetiforme [OR= 13,10 (1,79, 95,85); $p < 0,0001$].

10

Por consiguiente divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis herpetiforme) en un individuo, detectando la presencia de una T en la posición + 1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina o la presencia de un residuo de leucina (L) en la posición 394 de un polipéptido de corneodesmosina (L20815), o ambos, de un individuo. Este aminoácido está en la posición 410 según la secuencia GB AF030130.

15

El alelo 2 o T en la posición +1243 confiere mayor riesgo de desarrollar dermatitis herpetiforme en comparación con eccema atópico porque un individuo heterocigoto en +1243 también tiene riesgo alto de desarrollar dermatitis.

Ejemplo A4. Análisis de desequilibrio de ligamiento

En este Ejemplo, a menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácidos en la secuencia de corneodesmosina se proporcionan en referencia a la numeración en la secuencia de GenBank L20815.

20

Anteriormente se mostró que C en la posición +1243 está en desequilibrio de ligamiento con T y G en la posición +619 y + 1240 respectivamente (Tazi-Ahnini et al, 1999a ; Allen et al, 1999). El desequilibrio de ligamiento se extiende a otros loci dentro de la secuencia codificante de corneodesmosina. Adicionalmente, usando el análisis genealógico con la prueba de transmisión de desequilibrio (TDT), Jenisch y sus colegas identificaron 6 alelos diferentes que codifican 6 secuencias de aminoácidos diferentes del gen de corneodesmosina (Jenisch et al, 1999).

25

Enfermedades de Grupo I

Los inventores mostramos que dentro del alelo 5 (CD5) y el alelo 6 (CD6), T (leu) en la posición +1243 está en desequilibrio de ligamiento potente con A (asp), AGT (ser), T (phe), A (ser), T (ser), T (leu), G (asp) y T (asn) de CD5 y A (asp), delección (-), T (phe), A (ser), T (ser), T (leu), G (asp) y C (asp) de CD6. Estas variantes están en la posición +442, + 468, +619, +1215, +1236, + 1243, +1515 y +1593, respectivamente.

30

Los inventores hemos descubierto una asociación importante de estas variantes con eccema atópico en nuestra colección. Por lo tanto, la detección de cualquiera de los cambios enumerados anteriormente y en desequilibrio de ligamiento con T en la posición +1243 (es decir, alelo 2) demostrado, puede usarse en lugar o además de la detección de nucleótido T (+1243) o aminoácido L (394 de L20815).

Por lo tanto, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 en un individuo, preferiblemente eccema o dermatitis, más preferiblemente eccema atópico o dermatitis herpetiforme, o susceptibilidad a cualquiera de estas enfermedades detectando uno cualquiera o más de estos cambios.

5 Por consiguiente, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1, detectando uno cualquiera o más de los siguientes residuos en las posiciones relevantes de un ácido nucleico de corneodesmosina, tal como se muestra en la Tabla A4.1 a continuación.

Posición del nucleótido	442	468	619	1215	1236	1243	1515	1593
Ácido(s) nucleico(s)	A	AGT	T	A	T	T	G	T
Posición del residuo (1)	127	137	186	385	392	394	485	511
Posición del residuo (2)	143	153	202	401	408	410	501	527
Residuo	D	S/-	F	S	S	L	D	D/N

10 Tabla A4.1. Polimorfismos de corneodesmosina y enfermedades de Grupo 1. (1): posición de aminoácido enumerada según la secuencia de GenBank L20815; (2): posición de aminoácido enumerada según secuencia de GenBank AF030130

15 Los cambios de ácido nucleico mencionados anteriormente conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de corneodesmosina. Por consiguiente, la detección de los residuos de nucleótidos en las posiciones de ácido nucleico relevantes también puede lograrse detectando sus efectos, es decir, detectando un cambio correspondiente en la secuencia de polipéptidos codificada. Por lo tanto, por ejemplo, en lugar o además de detectar un polimorfismo en la posición +1243 de la secuencia de ácido nucleico usando sonda nucleica o enzima digestiva específica (por ejemplo, HphI), pueden usarse anticuerpos monoclonales que son capaces de distinguir entre un residuo L en la posición 394 y un residuo S en la posición 394.

20 También los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1, detectando uno cualquiera o más de los siguientes residuos en las posiciones relevantes de polipéptido de corneodesmosina, tal como se muestra en la Tabla A4.1.

Sumario

25 Los inventores hemos mostrado una asociación de un marcador dentro del gen de corneodesmosina que proporciona una susceptibilidad aumentada al eccema atópico y a la dermatitis herpetiforme. Debe mencionarse en la presente que el alelo de corneodesmosina que tiene C en + 1243 (alelo 1) está asociado con la psoriasis y el acné vulgar, lo cual sugiere que los dos alelos dan lugar a susceptibilidades diferentes. El alelo 2 (L394) está asociado con la disfunción de barrera (por ejemplo, dermatitis, enfermedad de Crohn) y el alelo 1 (S394) con la descamación alterada (por ejemplo, psoriasis, acné).

30 Los inventores mostramos la asociación de los polimorfismos en +1243 del gen de corneodesmosina con el eccema atópico y la dermatitis. La sustitución en la posición +1243 proporciona un cambio de aminoácido L394S. Sin la intención de restringirnos a la teoría, creemos que ésta sustitución interfiere con el procesamiento de corneodesmosina, contribuyendo por la tanto a descamación incrementada.

35 Los inventores hemos descubierto que los polimorfismos de corneodesmosina que proporcionan cambios de aminoácidos (Ser143/Asp, Ser153/-, Ser202/Phe, Ser401/Gly, Ser408/Ala, S410/L, Asp527/Asn; posición según la secuencia de GB AF030130) o (Ser127/Asp, Ser137/-, Ser186/Phe, Ser385/Gly, Ser392/Ala, S394/L, Asp511/Asn; posición según la secuencia de GB L20815) tienen una función importante en la maduración de queratinocitos y el proceso de descamación. El procedimiento de detección para estos polimorfismos se describe en Jenisch et al, 1999 and Guerrin et al, 2001. Por consiguiente demostramos que existe una fuerte relación entre el procesamiento proteolítico de la corneodesmosina y la sensibilidad de la piel normal y la integridad de la piel enferma donde existe una perturbación en la función de barrera que incluye psoriasis, acné y dermatitis.

Ejemplo A5. Polimorfismo del gen de corneodesmosina (S) en la posición 180

En este Ejemplo, a menos que se indique lo contrario, las posiciones de aminoácidos en la secuencia de corneodesmosina se proporcionan en referencia a la numeración en la secuencia de GenBank L20815.

45 *Identificación del polimorfismo del gen de corneodesmosina + 180*

La variante del gen S en la posición 180 se identifica mediante secuenciación de un alelo S clonado (Guerrin et al, 2001). El cambio de ácido nucleico de C a T en la posición +180 proporciona un cambio de aminoácido de L en la posición 40 (L20815) a F. Este aminoácido está muy conservado en las especies mamíferas. Las alineaciones secuenciales de secuencias S de humanos, ratones y cerdos mostraron que L40 se conserva entre estas especies tal como se detalla más adelante en la Tabla A5.1.

Tabla A5. 1. Alineación de secuencias de corneodesmosina. El número de aminoácido se proporciona con referencia a la numeración de la secuencia con número de acceso de GenBank L20815. La sustitución de ácido nucleico C a T en la posición 180 proporciona cambio de aminoácido L a F en la posición 56 de la proteína corneodesmosina según la secuencia de GB AF030130.

Ratón	ITSPNDPCLI
Cerdo1	IASPNDPCLL
Cerdo2	IASPSDPCLL
Humano	ITSPNDPCL ₄₀ T

Proteólisis de quimotripsina

Se sintetizan péptidos que corresponden a fragmentos de corneodesmosina y comprenden aminoácidos en la posición 40 y alrededor de la misma (L20815; que corresponde a la posición 180 en la secuencia de nucleótidos). Los péptidos se exponen a quimotripsina en una solución amortiguadora apropiada y se identifican los productos de digestión. Se sabe que la quimotripsina escinde el enlace peptídico en el extremo C terminal a un residuo de F, Y o W, pero no el extremo C terminal a un residuo de L.

Los péptidos P1 y P2 (aminoácidos de tamaño 38, que comprenden L y F en la posición 40 de L20815 respectivamente) se exponen a quimotripsina. El péptido P1 tiene la secuencia PTRITSPNDPCL₄₀TGKGDSSGFSGSSSSGSSISSAR, mientras el péptido P2 tiene la secuencia PTRITSPNDPCF₄₀TGKGDSSGFSGSSSSGSSISSAR.

Se descubrió que el péptido P1 con L en la posición 40 de L20815 proporciona dos productos de proteólisis: PTRITSPNDPCL₄₀TGKGDSSGF y SGSSSSGSSISSAR. Sin embargo, el péptido P2 con F en la posición 40 de L20815 proporciona tres péptidos pequeños PFRITSPNDPCF, TGKGDSSGF y SGSSSSGSSISSAR. Los resultados mencionados anteriormente se confirman mediante la utilización de Expasy Molecular Biology Server en <http://www.expasy.ch/>. Se prevé que los péptidos que tienen las secuencias P1 y P2 se escindan de forma diferente por quimotripsina.

Esto demuestra que el cambio de aminoácido de L a F crea un nuevo sitio de quimotripsina dentro de corneodesmosina. Esto tiene un efecto importante sobre la maduración de corneodesmosina durante la diferenciación y descamación queratinocítica. Por lo tanto divulgamos una asociación de un polimorfismo de aminoácido L a F en corneodesmosina y una enfermedad fenotípica.

Por lo tanto, los inventores divulgamos un procedimiento para diagnosticar una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis herpetiforme, preferiblemente eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de un sitio de escisión de proteasa en un polipéptido de corneodesmosina de un individuo. La detección del sitio de proteasa puede hacer en la secuencia de polipéptidos o detectando un cambio de ácido nucleico que codifica un sitio de proteasa.

Preferiblemente, el sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de SCCE o SCTE.

Enfermedades de Grupo I

Los inventores hemos descubierto en particular que la sustitución de aminoácido de L a F en la posición 40 está asociada con enfermedades de Grupo 1 (por ejemplo, eccema y/o dermatitis). Esta sustitución es provocada por un cambio de C a T en la posición 180 del ácido nucleico de corneodesmosina.

Por lo tanto, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis herpetiforme, preferiblemente eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de una F en la posición 40 de un polipéptido de corneodesmosina de un individuo.

Los inventores proporcionamos adicionalmente el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis

herpetiforme, preferiblemente eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de una T en la posición 180 de un ácido nucleico de corneodesmosina de un individuo.

Ejemplo A6. Identificación del polimorfismo del gen de corneodesmosina +619

5 Los inventores demostramos que la sustitución de ácido nucleico C a T en la posición +619 proporciona un cambio de aminoácido de S a F en la posición 186 según la numeración en L20815 y en la posición 202 según la numeración en AF030130. Esto crea un nuevo sitio quimotróptico dentro de la proteína de corneodesmosina. Hemos descubierto que la serina en la posición 186 está muy conservada en las especies mamíferas.

10 Los inventores demostramos adicionalmente que F en la posición 186 está asociada con barrera cutánea defectuosa tal como en eccema y dermatitis. F en la posición 186 se encuentra en CD5 y CD6 del polipéptido de corneodesmosina.

Enfermedades de Grupo I

15 Por lo tanto, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis herpetiforme, preferiblemente eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de una F en la posición 186 de un polipéptido de corneodesmosina de un individuo.

20 Los inventores proporcionamos adicionalmente el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente dermatitis o susceptibilidad a dermatitis, preferiblemente dermatitis herpetiforme, preferiblemente eccema, preferiblemente eccema atópico) en un individuo, detectando la presencia de una T en la posición 619 de un ácido nucleico de corneodesmosina de un individuo.

Ejemplos C: perfiles de proteólisis/maduración de proteínas desmosomales y corneodesmosomales mediada por proteasa

Ejemplos CI. Producción de SCTE recombinante

La enzima trípica del estrato córneo (SCTE) se clona y expresa en una forma activa de modo que tiene actividad enzimática completa.

Vectores de expresión usados

25 La expresión se logra usando diferentes sistemas de vectores para lograr la expresión proteica en un nivel alto y permitir la purificación. Se usan tres sistemas de vectores. *Sistema de células de insectos*: Sin etiqueta His en los extremos terminales; se usan vectores pMT/V5-HisA, B o C de Invitrogen, dependiendo del marco de lectura. Expresión en células de insecto S2 (*Drosophila*); purificación tal como se describe en Hansson et al., 1994.
30 *Sistema retroviral*: Sin etiqueta His; vectores retrovirales de Clontech (pLNCX2). La proteína se expresa en células mamíferas murinas y se purifica tal como se describe en Hansson et al., 1994.

Sistema pcDNA3.1. Etiqueta His en el extremo C terminal; se usan vectores (pcDNA3.1, ABC con tres ORF) de Invitrogen. Se logra la expresión de proteína en células COS-7 (Células de riñón de mono africano verde). Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

35 Los cebadores de PCR que cubren el marco de lectura abierto se diseñan manualmente, es decir, a ojo usando la secuencia de SCTE (GB: AF168768). Todos los cebadores son de Invitrogen.

Directo (5' A 3'): GGA AAT CAG GTG CAG CG.

Inverso (5' A 3'): GAT GAC TCA GGA GTT GGC.

40 El ARN total de la epidermis humana se transcribe inversamente en ADNc con el kit Gold RNA PCR de Applied Biosystems. El ciclo de RT comprende hibridación durante 10 mins a 25°C, con posterior Transcripción inversa durante 12 mins a 42°C. La PCR se lleva a cabo usando Taq Polimerasa Gold de Applied Biosystems con 2,0 mM de Mg²⁺, 40 ciclos. Cada ciclo de PCR consiste en Activación de taq a 95°C durante 10 mins, Desnaturalización: 94 durante 30 seg, Apareamiento: 58,8°C durante 1min, Extensión: 72°C durante 20 segundos y Apareamiento/Extensión: 72°C durante 7 mins.

45 La amplificación por PCR se verifica sobre un gel de agarosa al 1,5%. Los productos de PCR se purifican a partir de los otros componentes de mezcla de PCR utilizando el kit de purificación por PCR de Stratagene Strataprep. El producto de PCR de SCTE purificado se usa como plantilla para la PCR de enzima de restricción. PCR flanqueada por de sitio de enzima de restricción.

50 Se elige el vector celular de insecto pMT/VS-His (Invitrogen, Cat No. K4120-20) para clonación. Este vector está disponible en 3 marcos de lectura, A, B y C. Cada marco de lectura facilita la clonación con expresión del péptido

de extremo C terminal. Se elige el marco de lectura correcto con respecto al codón de inicio del inserto de ADN de SCTE.

5 Se eligen los sitios de enzima de restricción (RE) alrededor del sitio de clonación múltiple del vector, que están dentro del marco de lectura con el codón de inicio de SCTE. La secuencia de ADN de SCTE se somete a detección para la presencia de sitios de enzima de restricción utilizando el programa Webcutter que se encontró en el sitio web NIH (www.nih.gov/jun/research/anal.html). Aquellos sitios de enzima de restricción que no se encuentran en la secuencia SCTE pero que se encuentran en el vector están potencialmente disponibles para uso.

10 Se descubre que el codón de inicio de SCTE está dentro del marco con el vector pMT/V5-HisC. Se elige KpnI como la primera enzima de restricción en el codón de inicio. NotI se elige como el segundo cebado después del codón de finalización. Los sitios de enzima de restricción se incorporan en los **cebadores de PCR de SCTE directos e inversos** para generar un producto de PCR de SCTE flanqueado por KpnI y NotI. Estos sitios permiten que la secuencia se inserte en el vector:

15 *Cebador de enzima de restricción directo de SCTE (5' a 3')*

ATTAGTA-GGGTAG-ATGGCTACAGCAAGACCC

Secuencia aleatoria-secuencia de enzima de restricción KpnI-secuencia de codón de inicio de SCTE

Cebador de RE directo de SCTE (5' a 3')

ATTAGTA GGTACC ATGGCTACAGCAAGACCC

20 • Secuencia aleatoria Seq de RE KpnI secuencia de codón de inicio de SCTE

Cebador de RE inverso de SCTE (3' a 5')

1) TCCAGGCCAACTC **CTGA GCGGCCGC ATATTA**

2) Secuencia de codón de finalización de SCTE Seq de RE NotI Secuencia aleatoria

Cebador de RE inverso de SCTE (5' a 3') (complemento)

25 TAATATGCGGC CGCTCAGGAG TTGGCCTGGA

El producto de PCR de SCTE de la PCR de cebador estándar se usa como la plantilla para la PCR de cebador de enzima de restricción.

30 Las condiciones de PCR son 2,5mM de Mg²⁺ a cualquier temperatura de apareamiento entre 57°C y 67°C. El producto de PRC de enzima de restricción de SCTE se digiere con las enzimas de restricción correspondientes (KpnI y NotI) de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes (Promega). El producto de PRC de enzima de restricción de SCTE digerido se purifica a partir de la mezcla de enzima de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa y el ADN se purifica a partir del gel usando el kit para extracción con gel de agarosa QiaexII de Qiagen. El inserto de SCTE ahora está listo para ligadura con el vector preparado.

Propagación de vector PMT/V5-HisC y digestión de enzima de restricción

35 El vector pMT/V5-HisC se propaga en células de E. Coli modificadas químicamente TOP 10 de Invitrogen (Invitrogen, Cat No.C4040-10). El protocolo se describe en el folleto de información de TOP 10: Agregar 1 µl del vector a un vial de células TOP 10 (que se descongelaron sobre hielo). Mezclar suavemente. Incubar durante 5 a 30mins sobre hielo. Aplicar choque térmico a las células durante 30 segundos a 42°C, sin agitación. Transferir inmediatamente de vuelta al hielo. Agregar 250 µl de solución amortiguadora SOC a temperatura ambiente. Cubrir el tubo fuertemente y agitar el tubo de forma horizontal a 37°C durante 1 hora. Extender uniformemente 50 µl de mezcla transformante sobre una placa de agar nueva que contiene ampicilina. Incubar durante toda la noche a 37°C. Se recogen colonias únicas y se utilizan para inocular ampicilina-LB y el cultivo se incuba durante toda la noche a 37°C. Se hacen soluciones concentradas de glicerol de los cultivos. El vector pMT/V5-HisC propagado se purifica a partir de las bacterias usando el kit DNA Mini-Prep de Qiagen, de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes.

40

45

El vector purificado se digiere con KpnI y NotI, tal como para el producto de PCR de enzima de restricción de SCTE. El vector digerido también se purifica a partir de la mezcla de enzima de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa y el ADN se purifica a partir del gel usando kit de extracción en gel de agarosa QiaexII de Qiagen. El vector ahora está listo para ligadura con el inserto de SCTE preparado.

Ligadura de vectores de pMTIV5-HisC y SCTE

El SCTE se liga al vector pMT/V5-HisC usando enzima T4 ADN Ligasa (Gibco, Cat No. 15224-017). La ligadura se lleva a cabo en una relación 5: 1, inserto de ADN: vector de acuerdo con el siguiente protocolo: ADN Ligasa (1U, μ l) 1 μ l, 5 x Solución amortiguadora de ligadura 4 μ l, inserto de SCTE (X μ g/ μ l), vector pMT ((X μ g/ μ l), Agua (hasta 20 μ l). La reacción de ligadura se incuba a 16°C durante toda la noche (flotando sobre agua helada a 16°C). La reacción de ligadura se evalúa mediante gel de agarosa al 0,7% (en comparación con muestras control sin ligar). Las células de E-Coli competentes se transforman con el constructo SCTE/Vector ligado para propagación.

Propagación del constructo de SCTE/Vector en células E-Coli. Las células TOP10 se transforman con el constructo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes, descrito anteriormente. Las células transformadas se siembran por estrías en placas de ampicilina-agar y se incuban durante toda la noche a 37°C. Se usan colonias únicas para inocular ampicilina-LB y el cultivo se incuba durante toda la noche a 37°C. Se hacen almacenamientos en glicerol de los cultivos. El constructo se purifica usando el kit DNA Mini-Prep de Qiagen.

Transfección por lípidos de células de insectos S2

Se cultivan células de insectos S2 (drosophila, de Invitrogen, Cat No. R690-07) tal como recomiendan los fabricantes en Drosophila Expression Medium (DES, Cat No. Q500-01) complementado con suero de ternera fetal y penicilina-estreptomycin. La transfección se lleva a cabo utilizando Cellfectin (Invitrogen, Cat No. 10362-010), una formulación liposomal, nuevamente de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

Inducción de expresión de proteína SCTE/Formación de líneas celulares estables

El vector pMT/V5-HisC tiene un promotor inducible por metal (inducible con sulfato de cobre), metalotioneína (MT), que permite la expresión de alto nivel del gen objetivo en células S2. La expresión proteica en las células se induce con sulfato de cobre, agregado hasta una concentración final de 500 μ M. Las células se incuban durante 1-4 días. Luego de la inducción las células se cosechan y almacenan hasta el análisis adicional. Se usa el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para determinar si ocurrió la expresión de proteína recombinante comparando la proteína total de las células inducidas y las células no inducidas.

Formación de líneas celulares estables

Después de demostrar que la proteína SCTE se expresa en células S2, la expresión se amplía creando líneas celulares estables. Las células producen blasticidina, que es un potente inhibidor translacional en sistemas procariontes y eucariotes. Se confiere resistencia a blasticidina después de la co-transfección del constructo SCTE/pMT/V5-HisC y el vector de selección pCoBlast (Invitrogen, Cat No. 1K5150-01) a la células S2. El protocolo se encuentra en el manual de sistema de expresión Drosophila (DES), que acompaña a todos los reactivos DES. La blasticidina (25 μ g/ml) se utiliza para seleccionar transfectantes estables.

Ampliación de expresión proteica

La expresión se amplía para purificación de la proteína usando volúmenes/matrazes más grandes. El manual de Invitrogen adjunto con las células S2 proporciona detalles de un protocolo para hacerlo. La purificación se lleva a cabo mediante FPLC. Se recogen diferentes fracciones y se analizan para la presencia de la proteína recombinante.

Ejemplo C2. Producción de SCCE recombinante

La enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) se clona y expresa en una forma activa de modo que tiene actividad enzimática completa.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Los cebadores de PCR que cubren el marco de lectura abierto se diseñan manualmente, es decir, a ojo usando la secuencia de SCCE (GB: NM005046). Todos los cebadores son de Invitrogen.

Directo (5' A 3'): CGG GCT CCA TGG CAA GAT C

Inverso (5' A 3'): GCG TCC TCA CTC CTG TGC

El ARN total de la epidermis humana se transcribe inversamente en ADNc con el kit Gold RNA PCR de Applied Biosystems. El ciclo de RT es tal como se describió previamente para SCTE, utilizando 2,0mM de Mg²⁺, 40 ciclos, el ciclo de PCR es tal como se describió para SCTE, excepto que el apareamiento se hace a 60°C durante 1 min.

PCR de sitio de enzima de restricción flanqueado

El marco de lectura correcto y los sitios de enzima de restricción alrededor del sitio de clonación múltiple se eligen con respecto al codón de inicio del inserto de ADN de SCCE. La secuencia de ADN de SCCE se somete a

detección para la presencia de sitios de enzima de restricción usando el programa Webcutter y los sitios de enzima de restricción se eligen tal como se describió previamente. Se descubre que el codón de inicio de SCCE está dentro del marco con el vector *pMT/V5-HisA*. Se elige EcoRI como la primera enzima de restricción en el codón de inicio. Xho 1 se elige como el segundo cebador después del codón de finalización.

- 5 Los sitios de enzima de restricción se incorporan en los **cebadores de PCR de SCCE directos e inversos** para generar un producto de PCR de SCCE flanqueado por EcoRI y XhoI. Estos sitios permiten que la secuencia se inserte en el vector:

Cebador de enzima de restricción directo de SCCE (5' a 3')

GCC AGC-GAA TTC-ATGGCA AGA TCC CTT CTC

- 10 Secuencia aleatoria-secuencia de enzima de restricción EcoRI-secuencia de codón de inicio de SCCE

Cebador de enzima de restricción inverso de SCCE (3' a 5')

ATGAAAAGCATCGCTAA-CTCGAG-AGCACT

Secuencia de codón de finalización de SCCE-secuencia de enzima de restricción XhoI-secuencia aleatoria

Cebador de enzima de restricción inverso de SCCE (5' a 3') (complemento)

- 15 AGTGCTCTCG AGTTAGCGAT GCTTTTTCAT

El producto de PCR de SCCE de la PCR de cebador estándar se usa como la plantilla para la PCR de cebador de enzima de restricción. Las condiciones de PCR son 2,0mM de Mg²⁺ a una temperatura de apareamiento de 62°C. El producto de PRC de enzima de restricción de SCCE se digiere con las enzimas de restricción correspondientes (EcoR1 y XhoI) de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes (Promega). El producto de PRC de enzima de restricción de SCCE digerido se purifica a partir de la mezcla de enzima de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa y el ADN se purifica a partir del gel usando el kit de extracción en gel de agarosa QiaexII de Qiagen. El inserto de SCCE ahora está listo para ligadura con el vector de *pMT/V5-HisA* preparado.

- 20 La expresión se amplía para purificación de la proteína usando volúmenes/matrazes más grandes. El manual de Invitrogen adjunto con las células S2 proporciona detalles. La purificación se lleva a cabo mediante FPLC. Se recogen diferentes fracciones y se analizan para la presencia de la proteína recombinante. Se describen detalles adicionales para la expresión y purificación de SCCE en Hansson et al., 1994 (J. Biol. Chem. 269 (30), 19420-19426), que describe la purificación de la enzima proteasa de SCCE.

Ejemplo C3. Escisión de proteínas de adhesión con SCCE y SCTE recombinantes

- 30 La ProSCCE recombinante se produce y purifica tal como se describió anteriormente. La ProSCCE recombinante se activa con tripsina unida a agarosa, tal como se describe en Brasttsand & Egelrud, 1999.

La proteínas se extraen de la epidermis humana en presencia de un detergente (extracto de solución amortiguadora TENP-40) y se incuban con SCCE activa a 37°C durante 4 h. Las reacciones se detienen mediante ebullición durante 2 mins después de agregar la solución amortiguadora de muestra de Laemmli. Las proteínas se someten a inmunotransferencia con anticuerpos con respecto a proteínas corneodesmosomales.

- 35 *Escisión de proteínas de adhesión mediante SCCE*

Con este Ejemplo los inventores demostramos que la SCCE recombinante es capaz de escindir proteínas de adhesión, en particular, Corneodesmosina, Placoglobina Desmogleína, Desmoplaquina, Envoplaquina y Desmocolina. Por lo tanto, estas proteínas de adhesión son sustratos de esta proteasa.

- 40 SCCE y Corneodesmosina: se descubrió que la corneodesmosina se proteoliza mediante SCCE recombinante. La forma nativa de corneodesmosina tiene un peso molecular de entre 50 y 56 kDa. Después de 2h de incubación las formas mayores de Corneodesmosina son de 36 y 46-43 kDa.

Escisión de proteínas de adhesión mediante SCTE

- 45 Con este Ejemplo los inventores demostramos que la SCTE recombinante es capaz de escindir proteínas de adhesión, en particular, Corneodesmosina, Placoglobina Desmogleína, Desmoplaquina, Envoplaquina y Desmocolina. Por lo tanto, estas proteínas de adhesión son sustratos de esta proteasa.

SCTE y Corneodesmosina: se descubrió que la corneodesmosina se proteoliza mediante SCCE recombinante. Después de 2h de incubación las formas mayores de Corneodesmosina son de 36 y 46-43 kDa.

Ejemplo C4. Perfiles de proteólisis. Materiales y Procedimientos*Producción de anticuerpos policlonales*

5 Los anticuerpos para corneodesmosina, SCCE, envoplaquina, desmoplaquina, desmocolina 1 y SLPI se producen en conejos mediante inyección de péptidos sintéticos conjugados con hemocianina de lapa californiana (KLH).

Los péptidos se acoplan a hemocianina de lapa californiana (KLH) utilizando procedimientos estándares. Los péptidos se diseñan comprendiendo las siguientes secuencias de aminoácido, derivadas de secuencias de GenBank relevantes tales como se muestran en la Tabla C4.1 a continuación:

Tabla C4.1. Los residuos de C en negrita se sintetizan para acoplamiento y no existen en la secuencia nativa.

Proteína	Secuencia de péptido	Nombre	Secuencia de GenBank
Corneodesmosina	FTKENPVKGSPGVC	SB2	GB: AF030130
SCCE	INDTMKKHR	SB1	GB: XM009002
SCCE	RRAQRIKASKS	SB4	GB: XM_009002
Envoplaquina	SASPTVPRSLR	SB3	GB: XM_008135
Desmoplaquina	SGKRDKSEEVQC	642	GB: XM_004463
Desmocolina 1	MENSLGPFQPC	641	GB: XM_004463
SLPI	CGKSCVSPVKA	644	GB: X04502

10 Se inyecta a los conejos péptido junto con KLH para conejos el día 1. A continuación se describe un breve protocolo. Día 1: mezclar aproximadamente 150µl (que contienen 300µg de conjugado) con un volumen igual de adyuvante completo de Freund pasando varias veces a través de una aguja 23G hasta que se forma una emulsión (que no se separa en reposo). Inyectar en el conejo subcutáneamente utilizando una aguja 25G. Día 22, repetir lo anterior pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. Día 43, repetir lo anterior exactamente. Día 53, tomar el primer sangrado de prueba de una vena del oído. Reforzar y volver a provocar el sangrado si es necesario.

Anticuerpos monoclonales

Se obtienen anticuerpos monoclonales contra antígenos de proteína de adhesión de Biotechnic, Alemania.

20 Estos comprenden anticuerpo antiplacoglobina dirigido contra PG5. 1 (Placoglobina (NM-021991)) y anticuerpo antidesmogleína 1 (XM- 008810) dirigido contra Dsg1 y Dsg2.

Extracción de proteína de la epidermis

25 Las proteínas se extraen a partir de biopsias en forma de "orejas de perro", que son pedazos triangulares de piel retirada para producir una cicatriz lineal nítida. Ésta no es piel retirada del espécimen de mastectomía enviado a los patólogos para diagnósticos. Todas las muestras son de pacientes femeninas que concurren a clínicas en la Universidad de Sheffield y se someten a mastectomías para carcinoma mamario. Se obtiene el consentimiento informado de las pacientes.

30 La epidermis se separa de la dermis incubando una biopsia de mama de cirugía de mama con solución A de tripsina (Life Technology, Francia) durante 18 h a 4°C. La epidermis se divide en dos partes. Una parte se utiliza para extracción de proteína y la otra para extracción de ARN (ver más adelante). La epidermis pelada se calienta 5 mins en solución salina amortiguada con fosfato a 56°C (Simon et al, 1997). La epidermis se homogeniza sobre en igual volumen de las siguientes soluciones amortiguadoras (tres veces en cada solución amortiguadora): 40 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de EDTA, 0,25 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, y 2 µg/ml cada una de aprotinina, pepstatina A y leupeptina (solución amortiguadora TE), solución amortiguadora TE que contiene 0,5% de Nonidet P-40 (solución amortiguadora TE-Nonidet P-40).

35 El gránulo luego se divide en tres partes que se extraen en un tercio del volumen original de la solución amortiguadora TE que contiene varias concentraciones de urea (4, 6 y 8 M) (soluciones amortiguadoras TEU). Después de cada extracción, los homogenizados se centrifugan durante 15 mins a 15.000 x g y los sobrenadantes se mantienen a -30°C hasta que se usan finalmente, el gránulo correspondiente a la última extracción en 8 M de urea se homogeneiza en 35 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 8M de urea, 50 mM de ditiotreitol, glicerol al 5%, 0,25 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 2 g/ml de cada una de aprotinina, pepstatina A y leupeptina (solución amortiguadora TUDTT), se incubaba a 95°C durante 30 mins y se centrifuga tal como se describe anteriormente

40

(este procedimiento fue descrito originalmente por Simon et al, 1997). Las concentraciones de proteínas se miden usando el ensayo proteico Coomassie Plus (Pierre Chemical Co, Rockford, IL).

Extracción de proteína del estrato córneo

5 Las proteínas de adhesión se extraen del estrato córneo de acuerdo con un procedimiento descrito por Guerrin et al, 1998. Brevemente, una tira de cinta se aplica a una biopsia de piel normal o lesional y no lesional de un paciente con psoriasis. Las tiras de cinta se incuban en acetona y el tejido se recupera mediante centrifugación (500 x g, 1min), se lava en acetona y se seca con aire. El polvo se hierve durante 10 mins en 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 que contienen SDS al 2% y 50 mM de DTT y la solución se centrifuga (10.000 x g, 10 mins).

10 Las proteínas se extraen del estrato córneo de grupos de pacientes normales y psoriásicos, tal como se describió anteriormente y se analizan mediante transferencias Western usando anticuerpos específicos contra proteínas corneodesmosomales. Mostramos que el perfil de proteínas extraídas epidérmicamente difiere entre individuos normales y enfermos (psoriásicos).

Transferencia Western

15 Las proteínas de biopsias epidérmicas y de estrato córneo (~1µg) se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (SDS-PAGE). Después de la electroforesis las proteínas se electrotransfieren a membranas de nitrocelulosa. Las membranas durante toda la noche a 4°C en Blotto (3% de leche en polvo, 2% de BSA, 0,1% de Tween 20 en TBS). Las membranas se sondan con anticuerpos primarios descritos más adelante durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación. Se obtienen anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra placoglobina y desmogleína de Progen (Heidelberg, Alemania) y se utilizan en una concentración de 5µg/ml diluida en Blotto. Los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra péptidos diseñados a partir de secuencias proteicas de desmocolina, desmoplaquina, SLPI, SCCE, proteína S y envoplaquina (Antibody Resource Centre, Sheffield University, RU) se utilizaron en una dilución 1:250. Las membranas se lavaron durante 3 x 5mins en Blotto y se incubaron en presencia del anticuerpo secundario, IgG HRP antirratón o anticonejo comercializado por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, EE.UU.) en una dilución 1: 1000 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se lavaron en TBS-Tween 20 (0,1 %) durante 3 x 5 mins y las proteínas se detectaron usando el sistema de detección de transferencia western ECL+Plus™ (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, RU).

Ejemplo C7. Perfiles de proteólisis de eccema de proteínas extraídas del estrato córneo

30 Las proteínas se extraen del estrato córneo de grupos de pacientes normales y eccematosos, tal como se describió anteriormente y se analizan mediante transferencias Western usando anticuerpos específicos contra proteínas corneodesmosomales. Mostramos que el perfil de proteínas extraídas epidérmicamente difiere entre individuos normales y enfermos (eccema).

Perfil de proteólisis de corneodesmosoma

35 El aumento en la proteólisis de proteínas desmo/corneodesmosomales en la piel con eccema se refleja en un aumento considerable en la cantidad de formas inmaduras de proteínas corneodesmosomales en la piel eccematosa comparada con la normal. La proteólisis aumentada provoca que las células se adhieran juntas a la superficie de la epidermis evitando el desprendimiento celular.

40 Por ejemplo, las formas de corneodesmosina de 36 y 46-43 kDa son la formas mayores en el estrato córneo en la piel normal y las formas de 52-56 kDa son muy raras en el estrato córneo. Existe un aumento de la proteólisis de corneodesmosina en la piel eccematosa, de modo que las formas de corneodesmosina de 36 y 46-43 kDa son las formas dominantes en el estrato córneo de pacientes con eccema. Esto demuestra que existe un aumento de proteólisis en la piel eccematosa.

45 Por lo tanto, los inventores divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema) en un individuo, detectando cualquiera de los cambios descritos anteriormente, preferiblemente la presencia o un nivel modulado, preferiblemente un nivel más alto de uno o más polipéptidos de corneodesmosina de 36,46-43 kDa en un individuo. También divulgamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a tal enfermedad (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema) en un individuo, detectando la ausencia o un nivel modulado, preferiblemente un nivel más bajo de polipéptidos de corneodesmosina de 52-56 kDa en un individuo.

50 El diagnóstico puede lograrse sometiendo a ensayo la abundancia relativa de los polipéptidos de 36 kDa, 46-43 kDa y 52-56 kDa.

Preferiblemente, los polipéptidos relevantes se detectan en un estrato córneo de un individuo, ya sea in vivo o ex-vivo (por ejemplo, en forma de una tira de cinta).

Ejemplos D: regulación génica

Ejemplo D1. Expresión de genes de proteína de adhesión, proteasa e inhibidor de proteasa en psoriasis sometida a ensayo usando conjuntos de oligonucleótidos

5 Los inventores utilizamos conjuntos de oligonucleótidos de Affymetrix que comprenden proteínas de adhesión, proteasas y genes inhibidores de proteasa desmosomales y corneodesmosomales. Estos genes se enumeran en las Tablas a continuación en los Ejemplos D2 a D7.

10 Se obtienen biopsias con sacabocados de la piel de pacientes implicados y no implicados con psoriasis, acné vulgar, ictiosis, queratosis pilaris, eccema atópico, enfermedad de Crohn, melanoma cutáneo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, linfoma cutáneo, cáncer de piel, un proceso maligno del tracto gastrointestinal y un proceso maligno de los pulmones. También se obtienen biopsias de donantes de sangre control sin relación.

15 Se extrae el ARN de cada muestra y se obtiene un promedio de 50, 20 y 15 µg de pieles lesionales, no lesionales y normales, respectivamente. Se utilizan aproximadamente 10 µg para preparar ARNc biotinilado y se utilizan 2 µg para hibridación con conjuntos Affymetrix U95A que contienen sondas para genes tal como se enumeran en las Tablas.

20 Se utiliza el programa informático GENECHIP para reflejar el nivel de expresión de cada gen convirtiendo las intensidades de imagen con respecto a la diferencia promedio en el nivel de expresión. La expresión de los genes en la piel normal se usa como referencia y los resultados se muestran en las Tablas a continuación.

Ejemplo D5. Expresión de genes corneodesmosomales en eccema sometidos a ensayo utilizando conjuntos de oligonucleótidos

25 La expresión de los genes corneodesmosomales se somete a ensayo tal como se describió para los pacientes con eccema, usando piel lesional de eccema ("implicada") y piel no lesional de eccema ("no implicada"). El nivel de expresión de cada gen en la enfermedad (implicados y no implicados) se compara con su expresión en la piel normal.

Los resultados se muestran en la Tabla D5.1 a continuación. Leyenda: ++: expresado normalmente , +++: expresado intensamente; ++++: expresión muy alta; +: regulación hacia abajo.

Tabla D5. 1.

Nombre del gen	Nivel de expresión		Número de acceso de GenBank
	Implicado	No implicado	
S/corneodesmosina	+	+	GB: AF030130
Desoplaquina	+	+	GB: XM 004463
Placoglobina	+	+	GB: NM_002230; GB: NM 021991
desmogleína 1	+	+	GB: XM 008810
desmocolina 1	+	+	GB: MX 008687
Envoplaquina	+	+	GB: XM 008135; U72543

(cont.)

plectina 1	+	++	GB: NM000445
S100A2	+	++	GB: AI539439 ; M87068
queratina 6A	++	++	GB: L42611
queratina 17	++	++	GB: Z19574
S100A8	+	++	GB: AI126134
S 100A7	+	+++	GB: AA586894

S100A9	+	++	GB: W72424
SPRR2A	+	++	GB: M21302
SPRR1B	+	+	GB: M19888
SPRK	+	+	GB: AI923984
HCR	+	+	GB : BAA81890
SEEK1	+	+	GB: BAA88130
SPR1	+	+	GB: BAB63315
STG	+	++	GB: BAA88132
Involucrina	+	+	GB: NM 005547
anexina A1/lipocortina	++	++	GB: X05908
Tricohialina	+	+	GB: NM 005547
colágeno, tipo VI, alfa 3 (COL6A3)	++	++	GB: NM_004369
Loricrina	+	+	GB: XM 048902

5 Por lo tanto, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema) en un individuo, detectando la modulación de la expresión, preferiblemente la regulación hacia arriba de la expresión de un polipéptido o ácido nucleico seleccionados del grupo que consiste en queratina 6A (L42611); queratina 17 (Z19574); anexina A1/lipocortina (X05908); y colágeno, tipo VI, alfa 3 (COL6A3) (NM_004369) en un individuo.

10 Adicionalmente, los inventores proporcionamos el diagnóstico de una enfermedad de Grupo 1 o susceptibilidad a una enfermedad de Grupo 1 (preferiblemente eccema o susceptibilidad a eccema) en un individuo, detectando la modulación de la expresión, preferiblemente la regulación hacia abajo de la expresión de un polipéptido o ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en S/corneodesmosina (AF030130); desoplaquina (XM-004463); placoglobina (NM_002230; (NM_021991); desmogleína 1 (XM_008810); desmocolina 1 (MX_008687); envoplaquina 9XM_08135; U72543); plectina 1 (NM000445); S100A2 (AI539439; M87068); S100A8 (A1126134); S100A7 (AA586894); S100A9); GB: W72424); SPRR2A); GB: M21302); SPRR1B (M19888); SPRK (AI923984); HCR (BAA81890); SEEK1 (BAA88130); SPR1 (BAB63315); STG (BAA88132); involucrina (NM_005547); tricohialina (NM_005547); y loricrina (XM_048902).

15

REFERENCIAS

- Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC, Barker JNWN. (1999). A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 353(9164); 1589-1590.
- 5 Brattsand M, Egelrud T. (1999). Protein purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem.* 274 (42): 30033-40.
- Chapman and Walsh (1990). Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 282(5); 304-310.
- Cork, M. J. (1997) The importance of skin barrier function. *J. Derm Treatment.* 8, S7-S13.
- 10 Egelrud T. (1993). Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in dequamation. *J Invest dermatol* 101, 200-204.
- Egelrud, T. (2000) Desquamation in the stratum corneum. *Acta. Derm. Venerol. Supp.* 208, 44-45.
- Ekholm IE, Brattsand M, Eglrud T. (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process. *J Invest Dermatol*, 114, 56-63.
- 15 Ekholm, E. and Egelrud, T. (1998) The expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in human anagen hair follicles: further evidence for its involvement in desquamation-like processes. *Brit. J Derm.* 139, 585-590.
- Elias, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, (6) 44-49.
- Guerrin M, Vincent C, Simon M, Tazi Ahnini R, Fort M, Serre G. (2001). Identification of six novel polymorphisms in the human corneodesmosin gene. *Tissue Antigens.* 57 (1): 32-8.
- 20 Guerrin, M., Simon, M., Montézin, M., Haftek, M., Vincent, C. and Serre, G. (1998) Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with product of the S gene and allows improved characterisation of its processing during keratinocyte differentiation. *J Biol. Chem.*, 273 22640-22647.
- Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T. (1994). Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem.* 269 (30): 19420-6.
- 25 Ishihara M, Yamaguata N, Ohno S, Naruse T, Ando A, Kawata H, Ozawa A, Ohkido M, Mizuki N, Shiina T, Ando H, Inoko H. (1996) Genetic polymorphisms in the keratin-like S gene within the human major histocompatibility complex and association on the susceptibility to psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*, 48: 182- 186.
- Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE, Westphal E, Voorhees JJ, Christophers E, Kronke M. (1999). Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis. *Tissue Antigens*, 54: 439-449.
- 30 Landmann, L. (1988) The epidermal permeability barrier. *Anat. Embryo. (Berl.)*. 172, 1-13.
- Menton and Eisen (1971). Structure and organisation of mammalian stratum corneum. *J Utrastruct. Res* 35: 247-264
- 35 North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Halzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR. Molecular map of the desmosomal plaque. *Journal of Cell Science* 112,4325-4336 (1999).
- Simon, M., Montézin, M., Guerrin, M., Durieux, J. J. and Serre, G. (1997) Characterisation and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J: Biol.Chem.*, 272,31770-31776.
- 40 Tazi Ahnini R, Camp NJ, Mee JB, Duff GW, Cork M, di Giovine FS (1999a). Genetic Association between the corneodesmosin (MHC) S Gene and Susceptibility to Psoriasis. *Hum. Mol. Genet.* 8 (6): 1135-1140.
- Tazi Ahnini R, di Giovine FS, Cox A, Keohane and Cork MJ. The corneodesmosin (MHC S) gene in Guttate psoriasis. *Lancet* 1999 14; 354: 597.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para proporcionar indicaciones útiles para el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad asociada con adhesión célula-célula disminuida entre células epiteliales

5 en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en eccema atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica, asma atópica pulmonar, asma postviral, hiperreactividad bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, úlcera péptica, impétigo, verrugas virales, Molluscum contagiosum, meningitis bacteriana, meningitis viral, úlcera péptica asociada a la penetración de *Helicobacteria pylori*, melanoma cutáneo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, linfoma cutáneo, un cáncer de piel, un proceso maligno del tracto gastrointestinal y un proceso maligno de los pulmones, comprendiendo el procedimiento la detección de una mutación en corneodesmosina seleccionada de la detección de uno cualquiera o más de:

- 15 (a) la presencia de una T en la posición +1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
 (b) la ausencia de un sitio de enzima de restricción *Hph*1 en la posición +1243 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
 20 (c) la presencia de un residuo de leucina (L) en la posición 394 de un polipéptido de corneodesmosina (L20815.1);
 (d) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (c);
 (e) los siguientes nucleótidos o uno cualquiera o más de los siguientes aminoácidos en las posiciones relevantes de un ácido nucleico o polipéptido de corneodesmosina:

Posición del nucleótido	442	468	619	1215	1236	1243	1515	1593
Ácido(s) nucleico(s)	A	AGT	T	A	T	T	G	T
Posición del residuo (1)	127	137	186	385	392	394	485	511
Posición del residuo (2)	143	153	202	401	408	410	501	527
Residuo	D	S/-	F	S	S	L	D	D/N

20 en el que "Posición del residuo (1)" se refiere a la numeración de la secuencia con el número de acceso L2081.1 y "Posición del residuo (2)" se refiere a la numeración de la secuencia con el número de acceso AF030130.1;

- 25 (f) la presencia de una T en la posición 180 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
 (g) la presencia de una F en la posición 40 de un polipéptido de corneodesmosina que tiene el número de acceso L20815.1;
 (h) la presencia de una F en la posición 56 de un polipéptido de corneodesmosina que tiene el número de acceso AF030130.1;
 (i) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (g) o (h);
 30 (j) la presencia de una T en la posición 619 de un ácido nucleico de corneodesmosina;
 (k) la presencia de una F en la posición 186 de un polipéptido de corneodesmosina; y
 (l) una mutación en un ácido nucleico de corneodesmosina que conduce a (k),

en una muestra de células o fluido corporal obtenida de un sujeto.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la adhesión es entre corneocitos.

35 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: eccema atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica e impétigo.

4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende detectar un alelo de corneodesmosina CD5 o un alelo de corneodesmosina CD6 en un individuo.

40 5. Un procedimiento para proporcionar indicaciones útiles para el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad asociada con adhesión célula-célula disminuida entre células epiteliales en un individuo

45 en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: eccema atópico, eccema seborreico, dermatitis de contacto irritativa, dermatitis de contacto alérgica e impétigo, comprendiendo el procedimiento detectar la presencia, ausencia o un nivel modulado de corneodesmosina o un fragmento de la misma, en una muestra de células o fluido corporal obtenida de un sujeto.

50 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende detectar uno o más de: (a) abundancia relativa de los polipéptidos de corneodesmosina de 36 kDa, 46-43 kDa y 52-56 kDa; (b) la presencia o un nivel elevados de uno o más polipéptidos de corneodesmosina de 36, 46-43 kDa; (c) la ausencia o un nivel modulado, preferiblemente un nivel más bajo de polipéptidos de corneodesmosina de 52-56 kDa en un individuo.

7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un polipéptido o fragmento se detecta en una epidermis de un individuo, preferiblemente *ex-vivo* en forma de una biopsia de piel o en el estrato córneo de un individuo, preferiblemente en forma de tira de cinta.
 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende detectar la regulación hacia abajo de la expresión de un polipéptido o ácido nucleico de proteína de adhesión que es S/corneodesmosina (AF030130.1).
- 5

Figura 1

1: AF030130. Informes ARNm de corneodesmosina...[gi:2921269]

Enlaces

Características Secuencia

LOCUS	AF030130	1725 bp	ARNm lineal	PRI 03-AUG-2000
DEFINICIÓN	ARNm de corneodesmosina de Homo sapiens, región codificante completa			
ACCESO	AF030130			
VERSIÓN	AF030130.1 GI:2921269			
PALABRAS	.			
CLAVE	Homo sapiens (humano)			
ORGANISMO	Homo sapiens			
FUENTE	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craniados; Vertebrados; Euteleósteos; Mamíferos; Euterios; Euarcontogliares; Primates; Haplorrinos; Catarrinos; Homínidos; Homo.			
REFERENCIA	1 (bases 1 a 1725)			
AUTORES	Guerrin, M., Simon, M., Montezin, M., Haftek, M., Vincent, C. y Serre, G.			
TÍTULO	La clonación de la expresión de corneodesmosina demuestra su identidad con el producto del gen S y permite la caracterización mejorada de su procesamiento durante la diferenciación queratinocítica.			
REVISTA	J. Biol. Chem. 273 (35), 22640-22647 (1998)			
PUBMED	9712893			
REFERENCIA	2 (bases 1 a 1725)			
AUTORES	Guerrin, M., Simon, M., Montezin, M., Vincent, C. y Serre, G.			
TÍTULO	Presentación directa			
REVISTA	Presentado (14-OCT-1997) LBPDM, Faculte de Medecine Purpan, 37 Allées Jules Guesde, Toulouse 31000, Francia			
CARACTERÍSTICAS	Ubicación/Calificadores			
fuelle	1..1725 /organismo= "Homo sapiens" /tipo_mol= "ARNm" /db_xref= "taxón:9606" /cromosoma="6" /mapa= "6p21.3" /tipo_célula= "queratinocito; corneocito" /tipo_tejido= "epidermis"			
REGIÓN	15..1604			
CODIFICANTE	/nota="asociada a desmosomas modificados específicos de corneocito; proteína de diferenciación tardía de epidermis; similar a proteína S de queratinocito diferenciado humano codificado por Número de acceso de GenBank L20815" /inicio_codón=1 /producto="corneodesmosina" /id_proteína="AAC24196.1" /db_xref="GI:2921270" /traducción= "MGSSRAPWMGRVGGHGMALLLAGLLLPGLAKSIGTFSDPCKD PTRITSPNDPCLTGKGDSSGFSSYSGSSSSGSSISSARSSGGSSGSSSSSSIAQGGSS AGSPFKPGTGYVSYSSSGSSSLQAGSSQLGSSSSSHSGSSGSSSSSSSSSSSSSS PQFSSSSPQVNGSALPTNDNSYRGI LNPSQPGQSSSSQTSGVSSSGQSVSSNQRPC SSDI PDSPCSGGPIVSHSGPYIPSSHSVSGGQRPVVVVVDQHGSGAPGVVQGPCCSNG GLPGKPCPPITSVDKSYGGYEVVGGSSDSYLVPGMTYSKGIYPVGYFTKENPVKGS GVPSFAAGPPISEKGFSSNPIIPSOAASSAIAFQPVGTGGVQLCGGGSTGSKGPCS PSSSRVPSSSSISSAGSPYHPCGSASQSPCSPPGTGSFSSSSSSQSSGKIILQPCGS KSSSSGHPCMSVSSLTLTGPPDGS PHDP SAGAKPCGSSSAGKIPCRSIRDILAQVKP LGPQLADPEVFLPQGE LLDSP"			
ORIGEN	1 ccgtgcagtc cgagatgggc tcgtctcggg cacctcggat ggggcgtgtg ggtgggcacg 61 ggatgatggc actgctgctg gctggctctcc tcctgccagg gaccttggtc aagagcattg 121 gcacctcttc agaccctctg aaggacccca cgcgtatcac ctcccctaac gaccctgcc 181 tcactgggaa ggggtgactcc agcggcttca gtagctacag tggctccagc agttctggca 241 gctccatttc cagtgccaga agctctgggt gtggctccag tggtagctcc agcggatcca 301 gcattgccca ggggtggttct gcaggatcct ttaagccagg aacggggtat tcccaggatca			

361 gctactcctc eggatctggc tctagtctac aaggtgcatc cggttcctcc cagctgggga
 421 gcagcagctc tctactcggga agcagcggct ctactcggg aagcagcagc tctcattcga
 481 gcagcagcag cagctttcag ttcagcagca gcagcttcca agtagggaat ggctctgctc
 541 tgccaaccaa tgacaactct taccgcggaa tactaaacce tcccagcct ggacaaagct
 601 cttcctcttc ccaaacctct ggggtatcca gcagtggcca aagcgtcagc tccaaccagc
 661 gtccctgtag ttcggacatc cccgactctc cctgcagtgg agggcccatc gtctcgact
 721 ctggcccta catccccagc tcccactctg tgtcaggggg tcagaggcct gtggtggtgg
 781 tgggtgacca gcacggttct ggtgcccctg gagtgggtca aggtccccc tgtagcaatg
 841 gtggccttc aggcaagccc tgtccccaa tcacctctgt agacaaatcc tatggtggct
 901 acgaggtggt ggggtggctcc tctgacagtt atctgggtcc aggcattgacc tacagtaagg
 961 gtaaaatcta tctgtgggc tacttcacca aagagaacc tgtgaaagc tctccagggg
 1021 tcccttcctt tgcagctggg cccccatct ctgagggcaa atacttctcc agcaaccca
 1081 tcatccccag ccagtcggca gcttctcgg ccattgcgtt ccagccagtg gggactggtg
 1141 ggggtccagct ctgtggaggc ggctccacgg gctccaaggg acctgctct cctccagtt
 1201 ctcgagtccc cagcagttct agcatttcca gcagcgcgg ttcacctac catccctgag
 1261 gcagtgttcc ccagagcccc tgctcccac caggcaccgg ctcttcagc agcagctcca
 1321 gttcccaatc gagtggcaaa atcctcttc agccttgtgg cagcaagtcc agctctctg
 1381 gtcacccttg catgtctgtc tctccttga cactgaactgg gggccccgat ggctctccc
 1441 atcctgatcc ctccgctggt gccaaagcct gtggctccag cagtgtctgga aagatcccct
 1501 gccgctccat ccgggatatc ctagccaag tgaagcctct ggggccccag ctagctgacc
 1561 ctgaagtttt cctaccccaa ggagagttac tcgacagtcc ataagtcaac tgttgtgtgt
 1621 gtgcatgctt tgggcacaaa caagcacata cactatatcc catatgggag aaggccagtg
 1681 cccaggcata gggttagctc agtttccctc cttccccaaa gagtg

Figura 2

1: L20815. Informes ARNm de proteína S...[gi: 414809]

Enlaces

Características Secuencia

LOCUS	HUMSPROT	2530 bp	ARNm lineal	PRI 02-SEP-1994
DEFINICIÓN	ARNm de proteína S humana, región codificante completa			
ACCESO	L20815			
VERSIÓN	L20815.1 GI:414809			
PALABRAS	gen s; proteína S; diferenciación celular; queratina; diferenciación			
CLAVE	queratinocítica; lorricrina.			
ORGANISMO	Homo sapiens (humano)			
FUENTE	<u>Homo sapiens</u> Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craniados; Vertebrados; Euteleósteos; Mamíferos; Euterios; Euarcontoglires; Primates; Haplorrinos; Catarrinos; Homínidos; Homo.			
REFERENCIA	1 (bases 1 2530)			
AUTORES	Zhou, Y. y Chaplin, D.D.			
TÍTULO	Identificación en la región de HLA clase I de un gen expresado de forma tardía en la diferenciación queratinocítica			
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (20), 9470-9474 (1993)			
PUBMED	8415725			
COMENTARIO	Texto fuente original: ARNm a ADNc de prepucio de neonato de Homo sapiens (biblioteca: lambda gt10 (de Clontech))			
CARACTERÍSTICAS	Ubicación/Calificadores			
fuente	1..2530 /organismo= "Homo sapiens" /tipo_mol= "ARNm" /db_xref= "taxón:9606" /mapa= "6p21.3" /tipo célula= "queratinocito" /tipo tejido= "prepucio" /etapa_des= "neonato" /línea germinal /bib_tejido= "lambda gt10 (de Clontech)"			
<u>REGIÓN</u>	63..1523			
<u>CODIFICANTE</u>	/nombre estándar= "proteína S" /nota="específica de capa celular granular epidérmica" /inicio_codón=1 /id proteína= " AAA21321.1 " /db_xref="GI:414810" /traducción= " MLALLAGLLLPGLAKSIGTFSPDCKDPTRITSPNDPCLTKG DSSGFSSYSGSSSSGSSISSARSSCGGSSGSSSCSSIAQGGGAGSFKPQTGYSQVSYSGSGSSLQAGSSQLGSSSSHSGSSGSHGSSSSSHSSSSSFQFSSSPQVGNSSALPTNDNSYRGILNPSQPGQSSSSSQTSGVSSGQSVSSNQRPCSSDIPDSPCSGGPIVSHSGPYIPSSHSVSGGQRPVVVVDQHGSGAPGVVQGPSPCSNGLPGKPCPPIITSVDKSYGGYEVVGGSSDSYLVPGMTYSKGIYPVGYFTKENPVKSGPVPSFAAGPPISEGGYFSSNPIIPSAASSAIAFPVGTGGVQLCGGGSTGSKGPCSPSSSRVPSSSISSSSGSPYHPCGSASQSPCPPGTGSPSSSSSQSSGKIILQPCGSKSSSSGHPCMSVSSILTGTGPDGSPHPDPSAGAKPCGSSSAGKIPCRSIRIS"			
<u>intrón</u>	99^100 /número=1			
<u>señal poliA</u>	2511..2516			
<u>sitio poliA</u>	2530			
ORIGEN	1 ccgatgcagtc cgagatgggc tegtctcggg caccctggat ggggcgctgtg ggtgggcacg 61 ggatggtggc actgctgctg gctggtctcc tccctgccagg gaccttggt aagagcattg 121 gcacctcttc agacctctgt aaggacccca cgcgtatac ccccccaac gacctctgcc 181 tcaactgggaa gggtgactcc agcggettca gtagctacag tggctccagc agttctggca 241 gctccatttc cagtgccaga agctctgggt gtggctccag tggtagctcc agcggatcca 301 gcattgcccc gggtggttct gcaggatctt ttaagccagg aacggggtat tcccagggtca 361 getactcttc cggatctggc tetagtctac aaggtgcatc cggttcctcc cagctgggga 421 gcagcagctc teactcggga agcagcggct cteactcggg aagcagcagc tctcattoga			

481 gcagcagcag cagctttcag ttcagcagca gcagcttcca agtagggaat ggctctgctc
 541 tgccaaccaa tgacaactct taccgaggaa tactaaaccc ttcccagcct ggacaaagct
 601 cttcctcttc ccaaacctct ggggtatcca gcagtggcca aagcgtcagc tccaaccagc
 661 gtccctgtag ttcggacatc cccgactctc cctgcagtgg agggcccatc gtctcgact
 721 ctggccccta catccccagc tcccactctg tgtcaggggg tcagaggcct gtggtggtgg
 781 tgggtggacca gcacggttct ggtgcccctg gagtggttca aggtcccccc tgtagcaatg
 841 gtggccttcc agggcaagccc tgtccccc aa tcacctctgt agacaaatcc tatggtggct
 901 acgaggtggt ggggtgctcc tctgacagtt atctggttcc aggcattgacc tacagtaagg
 961 gtaaaatcta tcctgtgggc tacttcacca aagagaaccc tgtgaaagge tctccagggg
 1021 tcccttctct tgcaactggg ccccccatct ctgagggcaa atacttctcc agcaacccca
 1081 tcatccccag ccagtcggca gcttctctcg ccattgcatt ccagccagtg gggactggtg
 1141 gggtcagct ctgtggaggc ggctccacgg gctccaaggg accctgctct ccctccagt
 1201 ctcgagtccc cagcagttct agcatttcca gcagctccgg ttcaccctac catccctgcy
 1261 gcagtgtctc ccagagcccc tgctccccac caggcaccgg ctctctcagc agcagctcca
 1321 gttcccattc gagtggcaaa atcctctctc agccttgtgg cagcaagtcc agctctctg
 1381 gtcacccttg catgtctgtc tcctccttga cactgactgg gggccccgat ggctctcccc
 1441 atcctgatec ctccgctggt gccaaagccct gtggctccag cagtgtctgga aagatcccct
 1501 gccctccat ccggatatcc tagcccaagt gaagcctctg gggccccagc tagctgaccc
 1561 tgaagttttc ctacccccag gagagttact cgacagtcca taagtcaact gttgtgtgtg
 1621 tgcattgcctt gggcacaaaac aagcacatac actatatccc atatgggaga aggccagtgc
 1681 ccaggcatag ggttagctca gttccctcc ttcccaaaag agtggttctg ctttctctac
 1741 taccctaagg ttgcagactc tctcttatca ccccttctc ctctctcttc tcaaaatggt
 1801 agattcaaag ctctctctt gattctctcc tactgtttaa attccattc caccacagtg
 1861 cccctcagcc agatcaccac cccttacaat tccctctact gtgttgaat ggtccattga
 1921 gtaacacccc catcaccttc tcaactggga aaccctgaa atgctctcag agcaccctctg
 1981 acgctgaag aagtataacc ttctcttcc cctttaccaa ataaagcaaa gtcaaacat
 2041 catctgaaa cagtggccac ttttcaactga cctctctog acatctagtc aaccaccca
 2101 atatgccact gggtttctgct cccaattcca cccaccctc cattacagag ctaccacgc
 2161 cctctagat caccgtcccc aacacaccca ttgcctctca aggcccttat ctgagccct
 2221 tcctgtggcc atttccctca gtgccagat gattccctgg gtgagggaga cactggggca
 2281 cctcagagg ttggagcagg ctccctgctg tcctggatc ctggacagat ggctcagtaa
 2341 actgtgggac taggtgcaga cttttgctt cttggagtcc tgggtctcct ctgagaggtc
 2401 tgggtggtgc tcctctacg cctctagagg tctctgtgt cctcattttc cttcaaaagc
 2461 gggtgtatt tetctctac cttccagctc ctccacaga ggaggaagac aataaatatt
 2521 tgttgaactg