

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 366 323**

21 Número de solicitud: 200930428

51 Int. Cl.:  
**A61K 49/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **08.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**19.10.2011**

71 Solicitante/s: **Centro Nacional de Investigaciones  
Cardiovasculares (CNIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Melchor Fernández Almagro, 3  
28029 Madrid, ES**  
**Universidad Autónoma de Madrid** (Titular al 50 %)

72 Inventor/es: **Sánchez-Madrid, Francisco;**  
**Fuente Flores, Hortensia de la;**  
**Mittelbrunn Herrero, María y**  
**Lamana Domínguez, Amalia**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de identificación de compuestos inmunomoduladores para la piel.**

57 Resumen:

Método de identificación de compuestos inmunomoduladores para la piel.

La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel, basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, y a un kit para llevar a cabo dicho método. Este método permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos tienen un efecto inductor de tolerancia inmunológica y, por tanto, es útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel.

Asimismo, este método permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos tiene un efecto fotoprotector frente a los rayos UV para la piel y, por tanto, es útil para la prevención del cáncer de piel.

ES 2 366 323 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de identificación de compuestos inmunomoduladores para la piel.

5 La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel, basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, y a un kit para llevar a cabo dicho método. Este método permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos tiene un efecto inductor de tolerancia inmunológica y, por tanto, es útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel. Asimismo, este método permite  
10 identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos tiene un efecto fotoprotector frente a los rayos UV para la piel y, por tanto, es útil para la prevención del cáncer de piel.

## Estado de la técnica anterior

15 Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos altamente especializadas que desempeñan un papel esencial en inmunidad y tolerancia. Las células dendríticas se encuentran en los tejidos periféricos donde actúan como “centinelas”, capturando antígenos para su presentación a los linfocitos CD4+ y CD8+. La maduración de las células dendríticas es inducida por exposición a patógenos, exposición a citoquinas proinflamatorias o por interacción con CD40, entre otros estímulos. En respuesta a la maduración, las células dendríticas alteran su patrón de migración de receptores, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad y secretan citoquinas y quimioquinas que inician o estimulan la respuesta linfocitaria (Steinman y Banchereau. 2007. Nature 449:419-426).

25 Las células dendríticas juegan un papel esencial en el desarrollo de los linajes de linfocitos T efectores o linfocitos Th (del inglés “T helper cells”) de tipo 1, de tipo 2 y el recientemente identificado linaje Th17 (Bettelli y Kuchroo. 2006. Nature 441:235-238; Mangan *et al.* 2006. Nature 441:231-234), así como la inducción de linfocitos T reguladores. En condiciones normales, la mayoría de las células dendríticas periféricas tienen un fenotipo inmaduro; expresan bajos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés “major histocompatibility complex”) de clase II y coestimuladoras y, por tanto, no son capaces de activar a las células T *naïve*. A pesar de su papel como presentadoras de antígenos y coestimuladoras de las células T *naïve*, las células dendríticas son importantes mediadores de la tolerancia inmune periférica y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria (Morelli y Thomson. 2007. Nat Rev Immunol 7:610-621). Históricamente, las células dendríticas inmaduras se han considerado principalmente no inflamatorias o tolerogénicas, mientras que las células dendríticas maduras se consideran capaces de inducir una respuesta proinflamatoria. Aunque generalmente correcta, esta visión es una simplificación (Wallet y Tisch. 2005. Clin Med Res 3:166-175). La tolerogenicidad de las células dendríticas no es una propiedad restringida únicamente a un subgrupo de células dendríticas ni a las células dendríticas inmaduras. De hecho, la tolerogenicidad de las células dendríticas se asocia a varios procesos, incluyendo resistencia a factores inductores de la maduración, producción de factores solubles tales como IL-10, y activación de enzimas tales como indoleamina 2,3-4 dioxigenasa (Morelli y Thomson. 2007. Nat Rev Immunol 7:610-621). A pesar de la importancia de células dendríticas como células presentadoras de antígenos, nuestro conocimiento acerca de las moléculas expresadas por las células dendríticas que podrían estar implicadas en el resultado final de la respuesta inmune (tolerancia o inflamación) es muy limitado.

Uno de los más potentes supresores de la respuesta inmune es la radiación UV. La exposición a la luz UV provoca eritema y edema, así como la iniciación de neoplasias de la piel que serían normalmente eliminadas por acción del sistema inmune. La radiación UV es uno de los más potentes inmunosupresores de la respuesta inmune (Schwarz. 1999. Allergy 54:1252-1261). Las neoplasias de la piel como consecuencia de la exposición a la luz UV se desarrollan, probablemente, porque la radiación UVB también reduce la respuesta inmune que las destruirían. La radiación UVB ha demostrado también ser capaz de suprimir la respuesta inmune a una amplia variedad de antígenos, incluyendo microorganismos. El impacto sobre la respuesta inmune de la radiación UVA, que representa el 95% de la radiación UV solar, ha sido menos estudiada, aunque estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de esta clase de radiación en la supresión de la respuesta inmune inducida por luz UV. (Aubin, F. 2003. Eur J Dermatol 13:515-523; Furio, L. 2005. J Invest Dermatol. 125. 1032-8. Legitimo, A. 2007. Clin Exp Immunol, 148 564-72. Stoebner, P.E. Br J Dermatol, 2007. 156 1315-20).

55 La radiación UV penetra en la dermis superior causando lesiones celulares y moleculares en las células dendríticas allí localizadas (células de Langerhans y células dendríticas dérmicas). El efecto de la radiación UV en las células dendríticas ha sido estudiado *in vivo* e *in vitro* (Bechettille *et al.* 2007. Tissue Eng 13:2667-2679; Hamakawa *et al.* 2006. Photodermatol Photoimmunol Photomed 22:116-123; Schwarz. 2005. Int Arch Allergy Immunol 137:187-193). Recientemente, varios grupos han descrito el efecto que la radiación UV tiene en el fenotipo y en la función de las células dendríticas derivadas de monocitos. La radiación UV provoca una maduración defectiva de las células dendríticas y un fenotipo migratorio anómalo (Bechettille *et al.* 2007. Tissue Eng 13:2667-2679; Schwarz. 2005. Int Arch Allergy Immunol 137:187-193). Sin embargo, los cambios en la expresión génica inducidos en las células dendríticas en respuesta a la exposición a la radiación UVA/UVB no han sido examinados de manera sistemática.

65 El sistema inmune de la piel es un compartimento altamente reactivo desde el punto de vista inmunológico y está implicado en la mayoría de las enfermedades dermatológicas inflamatorias, incluyendo la psoriasis y la dermatitis (Nestle y Nickoloff. 2007. J Clin Invest 117:2382-2385). El uso de fototerapia para tratar enfermedades inflamatorias de la piel es otro ejemplo del efecto inmunosupresor de la radiación UV (Aubin, F. 2003. Eur J Dermatol 13:515-

523; Kist y Voorhees. 2005. *Adv Dermatol* 21:235-250; Stern. 2007. *P N Engl J Med* 357:682-690). El papel que los linfocitos T desempeñan en la patogénesis de estas enfermedades ha sido ampliamente estudiado; por el contrario, la implicación de las células dendríticas dérmicas, más recientemente identificadas (Lenz *et al.* 1993. *J Clin Invest* 92:2587-2596; Nestle *et al.* 1993. *J Immunol* 151:6535-6545), está sólo comenzando a ser comprendida (Klechevsky *et al.* 2008. *Immunity* 29:497-510). La efectividad de la fototerapia puede depender de los efectos que la radiación UV tiene sobre la expresión de moléculas reguladoras del sistema inmune en las células dendríticas, sin embargo, las dianas y los mecanismos efectores de la fototerapia son hasta la fecha desconocidos.

### Explicación de la invención

La exposición solar induce una inmunosupresión local y sistémica en el cuerpo humano. Distintas evidencias indican que este fenómeno es principalmente consecuencia del efecto que la luz UV ejerce en las células dendríticas de la piel. Sin embargo, los cambios en la expresión génica inducidos en las células dendríticas en respuesta a la exposición a la radiación UV no han sido examinados de manera sistemática.

Con el fin de investigar las bases moleculares de este tipo de inmunosupresión, en la presente invención se han analizado *in vitro* los cambios en el perfil de expresión génica inducidos por la radiación UV en células dendríticas derivadas a partir de monocitos, prestando especial interés a los genes implicados en la regulación de la respuesta inmune. La radiación UV promueve la disminución de la expresión de los genes del receptor de proteína tirosina fosfatasa de tipo E (*PTPRE*), el ligando del coestimulador inducible (*ICOSL*), galectina-1 (*Gal-1*), galectina-3 (*Gal-3*), la proteína adaptadora similar a Src (*SLA*) o el supresor de la señalización de citoquinas 1 (*SOC1*); y el aumento de la expresión de los genes de trombospondina-1 (*THBS1*) o la proteína de arresto del crecimiento y daño al DNA (*GADD45A*) en las células dendríticas derivadas a partir de monocitos. Este estudio ha permitido desarrollar un método para identificar compuestos o mezclas de compuestos inmunomoduladores para la piel basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de estos genes en células dendríticas y/o de Langerhans.

El cáncer de piel constituye la enfermedad cancerosa más frecuente, diagnosticándose cada año más de 2 millones de nuevos casos en el mundo. La radiación UV de la luz solar es el principal factor de riesgo de este tipo de cáncer y, como en cualquier otro tipo de cáncer, las medidas preventivas dan como fruto una disminución de la morbimortalidad. La utilización de fotoprotectores es una de las medidas más recomendables para prevenir los efectos nocivos de la radiación solar. Para determinar el factor de protección (FPS) de los filtros solares, actualmente se valora su capacidad para prevenir el eritema. Sin embargo, la radiación UV produce alteraciones en las respuestas inmunes, tanto a nivel local como sistémico, que hacen que seamos más susceptibles a sufrir toda una serie de efectos indeseables y a más largo plazo que una quemadura. Por ello, un fotoprotector eficaz no solo debe proteger frente al eritema sino que ha de ser capaz de preservar la inmunidad de la piel. El método de la presente invención permite identificar compuestos o mezclas de compuestos inmunomoduladores con efecto fotoprotector frente a los rayos UV para la piel, proporcionando una respuesta a esta necesidad.

El uso de fototerapia para tratar enfermedades inflamatorias de la piel, como la dermatitis o la psoriasis, es otro ejemplo del efecto inmunosupresor de la radiación UV. El método desarrollado en la presente invención, asimismo, permite evaluar si un determinado compuesto o mezcla de compuestos es capaz de inducir cambios en el patrón de expresión génica en las células dendríticas y/o células de Langerhans similares a los producidos mediante el tratamiento con luz UV y, por tanto, permite identificar compuestos o mezclas de compuestos útiles, por si solos o en combinación con radiación UV, para el tratamiento enfermedades dermatológicas inflamatorias.

La inmunomodulación es un abordaje terapéutico que consiste en intervenir en los procesos de autorregulación del sistema inmunológico. La expresión de "inmunomodulación" se refiere a la acción que ejerce un determinado compuesto o mezcla de compuestos sobre los procesos de autorregulación que dirigen el sistema inmunológico. Un inmunomodulador es una sustancia que regula, aumentando o disminuyendo, las funciones del sistema inmunológico.

La expresión "efecto inductor de tolerancia inmunológica", tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la capacidad que un compuesto o una mezcla de compuestos tiene para evitar la aparición o atenuar la respuesta inmunológica mediada por las células dendríticas y/o la células de Langerhans de la piel.

La expresión "efecto fotoprotector de rayos UV", tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la capacidad que un compuesto o una mezcla de compuestos tiene para evitar o atenuar la inmunosupresión que la radiación UV ejerce sobre la respuesta inmunológica mediada por las células dendríticas y/o la células de Langerhans de la piel.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel (de aquí en adelante, método primero de la invención), que comprende:

- a. obtener células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas;
- b. incubar las células del paso (a) con el compuesto o la mezcla de compuestos;

## ES 2 366 323 A1

- d. detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCSI*, *THBS1* o *GADD45A*, en las células del paso (b), y
- e. comparar la cantidad del producto detectada en el paso (d) con una cantidad de referencia en un control, y
- f. asignar un efecto inmunomodulador al compuesto o mezcla de compuestos a una diferencia significativa observada en la comparación del paso (e).

Preferiblemente, en el paso (d) del método primero de la invención se detecta la cantidad del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCSI*, *THBS1* y *GADD45A*, en las células del paso (b).

La fototerapia clásica ha empleado el uso de radiación UV para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel como, por ejemplo, pero sin limitarse acné, dermatitis atópica, vitíligo o psoriasis. El método primero de la invención permite evaluar si un determinado compuesto o mezcla de compuestos es capaz de inducir cambios en el patrón de expresión génica en las células dendríticas y/o células de Langerhans similares a los producidos con el tratamiento mediante luz UV. Por tanto, el método primero de la invención permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos es útil para el tratamiento una enfermedad inflamatoria de la piel, preferiblemente, seleccionada de la lista que comprende: acné, dermatitis atópica, vitíligo o psoriasis.

En una realización preferida del método primero de la invención, el efecto inmunomodulador es un efecto inductor de tolerancia inmunológica.

En una realización más preferida del método primero de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f), es:

- i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de, al menos, uno de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCSI* significativamente menor que la cantidad de referencia del control o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

En una realización aún más preferida del método primero de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si existe una diferencia significativa en el paso (f) para al menos dos, para al menos tres, para al menos cuatro, para al menos cinco, para al menos seis, o para al menos siete de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCSI*, *THBS1* o *GADD45A*, donde dicha diferencia significativa se selecciona de entre:

- i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCSI* significativamente menor que la cantidad de referencia del control, o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

En una realización preferida aún más preferida del método primero de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* y *SOCSI* significativamente menor que la cantidad de referencia del control y
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* y *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

En una realización preferida alternativa de este primer aspecto de la invención, el método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel, además de los pasos (a-b) y (d-f) descritos anteriormente, comprende entre los pasos (b) y (d) un paso:

- c. irradiar con radiación ultravioleta (UV) las células del paso (b).

Por tanto, una realización preferida alternativa de este primer aspecto de la invención se refiere a un método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel (de aquí en adelante, método segundo de la invención), que comprende:

- a. obtener células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas;

## ES 2 366 323 A1

- b. incubar las células del paso (a) con el compuesto o la mezcla de compuestos;
- c. irradiar con radiación ultravioleta (UV) las células del paso (b).
- 5 d. detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, en las células del paso (c), y
- e. comparar la cantidad del producto detectada en el paso (d) con una cantidad de referencia en un control, y
- 10 f. asignar un efecto inmunomodulador o un fotoprotector de rayos UV al compuesto o mezcla de compuestos a una diferencia significativa observada en la comparación del paso (e).

15 Preferiblemente, en el paso (d) del método segundo de la presente invención, se detecta la cantidad del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* y *GADD45A*, en las células del paso (c).

20 En una realización preferida del método segundo de la invención, el efecto inmunomodulador es un efecto inductor de tolerancia inmunológica y, por tanto, permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos en combinación con radiación UV es útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la piel, preferiblemente, seleccionada de la lista que comprende: acné, dermatitis atópica, vitíligo o psoriasis.

En una realización más preferida del método segundo de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f), es:

- 25 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de, al menos, uno de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCS1* significativamente menor que la cantidad de referencia del control o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.
- 30

En una realización aún más preferida del método segundo de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si existe una diferencia significativa en el paso (f) para al menos dos, para al menos tres, para al menos cuatro, para al menos cinco, para al menos seis, o para al menos siete de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, donde dicha diferencia significativa se selecciona de entre:

- 35 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCS1* significativamente menor que la cantidad de referencia del control, o
- 40 ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

45 En una realización preferida aún más preferida del método segundo de la invención, el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- 50 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* y *SOCS1* significativamente menor que la cantidad de referencia del control y
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* y *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

55 La radiación UV induce en células de Langerhans y dendríticas cambios en la expresión de los genes reguladores de la respuesta inmune *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS*, *THBS1* y *GADD45A*. Un compuesto o una mezcla capaz de impedir que la radiación UV indujera dichos cambios tendría, por tanto, un efecto fotoprotector frente a los rayos UV para la piel. Por tanto, en una realización preferida alternativa, el método segundo de la invención permite identificar si un compuesto o una mezcla de compuestos tiene un efecto fotoprotector y, por tanto, es útil para la prevención del cáncer de piel.

60 En una realización más preferida del método segundo de la invención, el efecto fotoprotector de rayos UV se asigna si la diferencia significativa del paso (f), es:

- 65 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de, al menos, uno de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCS1* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente menor que la cantidad de referencia del control.

## ES 2 366 323 A1

En una realización aún más preferida del método segundo de la invención, el efecto fotoprotector de rayos UV se asigna si existe una diferencia significativa en el paso (f) para al menos dos, para al menos tres, para al menos cuatro, para al menos cinco, para al menos seis, o para al menos siete de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCSI*, *THBS1* o *GADD45A*, donde dicha diferencia significativa se selecciona de entre:

- i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCSI* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control, o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente menor que la cantidad de referencia del control.

En una realización aún más preferida del método segundo de la invención, el efecto fotoprotector se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* y *SOCSI* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control y
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* y *GADD45A* significativamente menor que la cantidad de referencia del control.

Las células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas del paso (a) pueden obtenerse a partir de diferentes fuentes mediante procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, las células dendríticas o las células de Langerhans pueden derivarse a partir de monocitos aislados de sangre periférica mediante cultivo en presencia de IL-4/GM-CSF o presencia de IL-4/GM-CSF y TGF- $\beta$ , respectivamente. Asimismo, las células dendríticas o las células de Langerhans podrían ser generadas a partir de precursores hematopoyéticos. También, las células dendríticas pueden aislarse directamente de sangre periférica, y las células de Langerhans o células dendríticas dérmicas pueden aislarse de explantes de piel. Preferiblemente, las células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas del paso (a) son humanas.

La mayoría de los efectos perjudiciales para la piel de la radiación solar se deben a la acción de la radiación (UV). Por convenio, el espectro ultravioleta se subdivide arbitrariamente en tres bandas de mayor a menor longitud de onda. Estas bandas o regiones se denominan UVA, UVB y UVC respectivamente. La región UVA abarca de los 400 a los 320 nm. La banda correspondiente a UVB engloba a las radiaciones comprendidas entre los 320 y 290 nm. La radiación UVC comprende las longitudes de onda menores a 290 nm (200-290 nm). Preferiblemente, la radiación empleada en el paso (c) del método segundo de la invención es radiación UVA, radiación UVB o una combinación de ambas.

En el contexto de la presente invención, el gen del receptor de proteína tirosina fosfatasa de tipo E (*PTPRE*, del inglés *protein tyrosine phosphatase, receptor type, E*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína *PTPRE*, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 1 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *PTPRE*.

En el contexto de la presente invención, el gen del ligando del coestimulador inducible (*ICOSL*, del inglés *inducible T-cell coactivator ligand*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína *ICOSL*, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2.
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

## ES 2 366 323 A1

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ICOSL.

5

En el contexto de la presente invención, el gen *Gal-1* también conocido como *galectina-1* o *LGALS1* (del inglés *lectin, galactoside-binding, soluble, 1*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína Gal-1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

10

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3.

15

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 3 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína Gal-1.

25

En el contexto de la presente invención, el gen *Gal-3* también conocido como *galectina-3* o *LGALS3* (del inglés *lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína Gal-3, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

30

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4.

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

35

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 4 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína Gal-3.

40

En el contexto de la presente invención, el gen de la proteína adaptadora similar a SRC (*SLA*, del inglés *Src-like-adaptor*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína SLA, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

45

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5.

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

50

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

55

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 5 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SLA.

60

En el contexto de la presente invención, el gen del supresor de la señalización de citoquinas 1 (*SOCS1*, del inglés *suppressor of cytokine signaling 1*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína SOCS1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6.

65

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

## ES 2 366 323 A1

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 6 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *SOCSI*.

En el contexto de la presente invención, el gen *THBS1*, también conocido como *TSP-1* o *thrombospondin 1* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína THBS1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7.

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 7 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína THBS1.

En el contexto de la presente invención, el gen de la proteína de arresto del crecimiento y daño al DNA (*GADD45A*, del inglés *growth arrest and DNA-damage-inducible*) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína GADD45A, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 8.

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 8 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GADD45A.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término “producto de la expresión” de un gen, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a los productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) de dicho gen. O a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de la expresión del gen, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con la misma o que pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión del gen obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas, o indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

La detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión del gen basada en una señal que se obtiene directamente del producto de la expresión del gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión del gen presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

## ES 2 366 323 A1

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión.

5 La detección del producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* puede realizarse determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de mareaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; o por cualquier otro medio.

15 En una realización preferida del método de la presente invención, el producto de expresión de los genes es el ARNm. En una realización más preferida del método de la presente invención, el ARNm se detecta mediante un microarray de ADN. En otra realización más preferida del método de la presente invención, el ARNm se detecta mediante RT-PCR.

20 La detección del producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* también puede realizarse determinando el nivel de las proteínas *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, mediante la incubación con un anticuerpo específico, por ejemplo, mediante *western-blot*, geles de electroforesis, *microarrays* de proteína, citometría de flujo, ELISA o cualquier otro método enzimático; o por cualquier otro medio.

El término “anticuerpo”, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epitopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. Anticuerpos que reconocen a la proteína *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* son conocidos en el estado de la técnica, como los que se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente descripción.

45 En otra realización preferida del método de la presente invención, el producto de expresión de los genes es la proteína. En una realización más preferida, la proteína se detecta en un extracto total obtenido a partir de las células. La expresión “extracto total” se refiere a un extracto obtenido de lisar las células con detergentes que solubilizan las proteínas de las distintas fracciones celulares (citoplásmicas, organelas, nucleares y las de membrana plasmática). Diversos detergentes empleados para la lisis y métodos de obtención de extractos totales son conocidos en el estado de la técnica. En otra realización más preferida, la proteína se detecta en un extracto de la fracción citoplásmica. La expresión “extracto de la fracción citoplásmica” se refiere a un extracto celular enriquecido con la fracción que corresponde al citoplasma de las células. Diversos detergentes empleados para la lisis y métodos de obtención de extractos citoplasmáticos son conocidos en el estado de la técnica.

55 En una realización preferida del método de la presente invención, la proteína se detecta mediante *western-blot*. En otra realización más preferida del método de la presente invención, la proteína se detecta mediante citometría de flujo.

60 Tal y como puede observarse en la figura 4 de los ejemplos de la presente solicitud de patente, cuando se analiza la cantidad del producto de la expresión de las proteínas *Gal-1* y *Gal-3* en la membrana de las células mediante citometría de flujo, se observa una variación en los niveles de expresión inversa a la observada cuando se analiza la cantidad del producto de la expresión de estas proteínas en el extracto total.

65 Por tanto, en una realización alternativa del método primero de la invención, una cantidad detectada en el paso (d) de la proteína *Gal-1* y/o *Gal-3* en la membrana de las células significativamente mayor que la cantidad de referencia del control permite en el paso (f) asignar al compuesto o mezcla de compuestos un efecto inductor de tolerancia inmunológica.

Por otro lado, en una realización alternativa del método segundo de la invención, una cantidad detectada en el paso (d) de la proteína Gal-1 y/o Gal-3 en la membrana de las células significativamente mayor que la cantidad de referencia del control permite en el paso (f) asignar al compuesto o mezcla de compuestos un efecto inductor de tolerancia inmunológica.

Además, en una realización alternativa del método segundo de la invención, una cantidad detectada en el paso (d) de la proteína Gal-1 y/o Gal-3 en la membrana de las células significativamente menor que la cantidad de referencia del control permite en el paso (f) asignar al compuesto o mezcla de compuestos un efecto fotoprotector de los rayos UV.

En una realización preferida, la cantidad del producto de la expresión de las proteínas Gal-1 y Gal-3 en la membrana de las células se analiza mediante citometría de flujo. En otra realización preferida, la cantidad del producto de la expresión de las proteínas Gal-1 y Gal-3 en la membrana de las células se analiza mediante western blot en un extracto de la fracción membranal obtenido a partir de las células. La expresión “extracto de la fracción membranal” se refiere a un extracto celular enriquecido con la fracción que corresponde a la membrana plasmática de las células. Diversos detergentes empleados para la lisis y métodos de obtención de extractos membranales son conocidos en el estado de la técnica.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de la expresión de los genes *TPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* detectada en el paso (d) con una cantidad de referencia deseable. Preferiblemente, dicha fuente de referencia son células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas irradiadas con luz UV que no han sido incubadas previamente con el compuesto o la mezcla de compuestos cuyo efecto inmunomodulador se evalúa por el método de la invención, radiadas o no con radiación UV, dependiendo de si se trata del método segundo o del método primero de la invención, respectivamente. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad del producto de expresión que permite asignar determinar si un compuesto tiene efecto inmunomodulador. La cantidad de referencia puede ser determinada por el método de la presente invención a partir de una fuente de referencia o control que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con las células dendríticas y/o las células de Langerhans que han sido incubadas con el compuesto o mezcla de compuestos en el paso (b). Por ejemplo, la fuente de referencia o control del método primero de la invención puede ser células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas sin incubar con el compuesto o la mezcla de compuestos y, por tanto, la cantidad de referencia sería la cantidad del producto de la expresión del gen o los genes detectados en el paso (d), en células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas sin incubar con el compuesto o la mezcla de compuestos. La fuente de referencia o control del método segundo de la invención puede ser, por ejemplo, células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas sin incubar con el compuesto o la mezcla de compuestos irradiadas con radiación UV y, por tanto, la cantidad de referencia sería la cantidad del producto de la expresión del gen o los genes detectados en el paso (d), en células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas sin incubar con el compuesto o la mezcla de compuestos irradiadas con radiación UV.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de la invención. En una realización preferida, el kit comprende los medios para determinar la cantidad del producto de expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* en células dendríticas aisladas y/o células de Langerhans aisladas. En una realización más preferida, el kit comprende los medios para determinar la cantidad del producto de expresión de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A* en células dendríticas aisladas y/o células de Langerhans aisladas.

Dicho kit puede comprender cebadores, sondas, anticuerpos poli o monoclonales, y todos aquellos reactivos necesarios para analizar las técnicas descritas anteriormente en este documento y/o conocidos en el estado de la técnica. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además compuestos y/o mezclas de compuestos, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el análisis de la expresión génica en DCs humanas inducida por la irradiación UV mediante RT-PCR. Se realizaron ensayos de RT-PCR para validar los cambios en la expresión de genes inducidos por la irradiación UV en DCs derivadas de monocitos humanos. Las DCs fueron expuestas o no a la irradiación UV usando el simulador

solar (3,7 J/cm<sup>2</sup> UVA + 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB). El RNA total fue extraído 6 horas después de la irradiación. Las sondas utilizadas para la RT-PCR se muestran en la Tabla 3. Los niveles de expresión se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen 18s. Las barras corresponden a log10 del aumento o disminución de la expresión génica con respecto a las células no irradiadas.

5

Figura 2. *Muestra los cambios en la expresión génica inducidos por la irradiación UV en DCs, MCs y KC primarios humano.* Las DCs derivadas de monocitos primarios humanos (moDCs), melancocitos (MCs) y queratinocitos (KC) fueron expuestas a la irradiación UV usando el simulador solar (3,7 J/cm<sup>2</sup> UVA + 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB) como en la Fig. 1, y el RNA total fue extraído 6 hrs después de la irradiación. Las sondas utilizadas para la RT-PCR se muestran en la Tabla 3. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a 18s. A. Genes que codifican para citoquinas y receptores de quimiocinas. B. Genes relacionados con el daño a DNA y respuesta a p53. C Genes potencialmente involucrados en inmunomodulación. Los resultados se muestran como log10 del aumento o disminución de la expresión génica con respecto a las células no irradiadas. Los datos corresponden a la media aritmética ± error estándar de la media.

10

15

Figura 3. *Muestra el análisis por Western blot de las proteínas cuyos genes están diferencialmente expresados en las DCs.* A, B. Las DCs se expusieron a la irradiación UV con el simulador solar como en la Fig. 1, y se cultivaron durante 24 horas antes de realizar la lisis e inmunoblot. Los experimentos fueron realizados al menos 3 veces. Las bandas específicas para cada proteína se cuantificaron mediante densitometría con respecto a vimentina (control de carga). A. Blots representativos. B. Resultados del análisis densitométrico representado como el ratio de la expresión en células irradiadas con respecto a las no irradiadas. Los datos corresponden a la media aritmética ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. C. Los MCs y KCs humanos se expusieron a la irradiación UV en las mismas condiciones que las DCs y analizadas por western blot como en A. Los datos corresponden a uno de tres experimentos realizados.

20

25

Figura 4. *Muestra la expresión de Galectina-1 y Galectina-3 en la superficie de la membrana de DCs.* A. Las DCs fueron expuestas a la irradiación UV como se señala en la Fig.1 y posteriormente cultivadas durante 24 horas. La expresión de galectina-1 y galectina-3 se realizó mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a la media aritmética ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. B. Expresión de galectina-1 y galectina-3 en la superficie de la membrana de DCs en respuesta a LPS. DCs inmaduras se cultivaron en presencia de LPS (10 ng/ml) durante 24 horas, posteriormente la expresión de las proteínas se determinó mediante citometría de flujo. C. Producción de IFN-gamma en co-cultivos de DCs y linfocitos T. Los linfocitos T CD4+ se co-cultivaron con DCs humanas alogénicas durante 5 días. Los niveles intracelulares de IFN-gamma se determinaron por citometría de flujo. Los datos corresponden a 1 de 3 experimentos realizados.

30

35

Figura 5. *Muestra un resumen de los genes modificados por la irradiación UV en DCs.* Los genes cuya expresión aumentó o disminuyó como consecuencia de la exposición a la irradiación UV fueron agrupados en grupos funcionales usando designaciones del Gene Ontology (WebGestalt) y datos publicados. En negrita e itálica se muestran los genes cuya expresión disminuyó. (\*) Genes seleccionados para ser corroborados por PCR.

40

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

45

### Ejemplo 1

50

*Genes regulados en DCs derivadas de monocitos humanos en respuesta a la irradiación UV utilizando un simulador solar*

Para identificar los genes de DCs derivadas de monocitos humanos cuya expresión aumenta o disminuye después de la exposición UVA/UVB, se utilizaron microarrays de RNA de genoma total humano. Las DCs derivadas de monocitos humanos se purificaron a partir de sangre periférica obtenida de 3 donantes sanos y se irradiaron con 3,7 J/cm<sup>2</sup> UVA + 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB, utilizando un simulador solar. Esta dosis de irradiación induce la secreción de TNF-alpha y modifica la expresión de diferentes receptores de superficie de las DCs sin causar hipodiploidia significativa (Mittelbrunn *et al.* 2005. *J Invest Dermatol* 125:334-342). El análisis estadístico de los valores de expresión génica de DCs irradiadas vs DCs no irradiadas reveló la modulación de 64 genes anotados (p< 0,05). De los 64 genes, 40 aumentaron su expresión (>2,0 veces) en respuesta a la irradiación UVA/UVB, estos genes están enumerados en la Tabla 1. Se detectó además la disminución en la expresión (>2,0 veces) de 24 genes listados en la Tabla 2.

60

65

De acuerdo con datos publicados en células linfoblastoides humanas y melanocitos humanos (Rieger *et al.* *Nucleic Acids Res* 32:4786-4803; Yang *et al.* 2006. *J Invest Dermatol* 126:2490-2506), se detectó el aumento en la expresión de genes asociados al daño por la irradiación UV, por ejemplo, genes involucrados en el daño a DNA y señalización de p53, como GDF15, FDXR, POLH, PCNA y PMAIP (Tabla 1), lo cual confirma la solidez de nuestro sistema.

## ES 2 366 323 A1

El análisis de agrupamiento de genes mediante las designaciones del Gene Ontology (WebGestalt) mostró que en varios grupos funcionales incluyendo el metabolismo de DNA, Ciclo Celular, Respuesta a Estrés y Procesos Inmunes se encuentra porcentaje significativo de los genes inducidos en respuesta a la irradiación UV ( $p < 0,05$ ). Otros grupos funcionales, como el Metabolismo del RNA así como genes involucrados en la Motilidad Celular contenían principalmente genes cuya expresión disminuyó en respuesta a la irradiación UV (Tablas 1 y 2).

Con el fin de corroborar los resultados de los microarrays, se seleccionaron 15 genes modulados para ser analizados mediante RT-PCR semicuantitativa con sondas TaqMan. La tabla 3 muestra las sondas TaqMan y las sondas correspondientes a los genes seleccionados para este análisis. Entre estos genes se encuentran algunos asociados a la regulación de la respuesta inmune, tales como CD163, inducible costimulator ligand (ICOSL), IL-1, Src-like adapter protein (SLA) (Reinhardt *et al.* 2006. *Can J Physiol Pharmacol* 84:221-226) y trombospondina-1 (THBS1). Como controles se incluyeron genes asociados a la respuesta a estrés cuya modulación en respuesta a la irradiación UV ha sido previamente descrita, (GDF15, FDXR, PLK2, PCNA). El análisis de RT-PCR semicuantitativa se llevó a cabo con las mismas muestras de RNA utilizadas en los microarrays. Los resultados confirman la alteración en la expresión de todos genes excepto AICDA y CD163 (Fig. 1).

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 366 323 A1

TABLA 1

*Genes cuya expresión aumenta en DCs irradiadas vs DCs no irradiadas*

5	Símbolo del Gen	Acceso al GenID	Nombre del Gen	<sup>a</sup> veces de inducción (log 2)
10	GDF15	9518	<i>Growth differentiation factor 15</i>	5,99
	IL1B	3553	<i>Interleukin 1, beta (IL1B)</i>	3,98
	FDXR	2232	<i>Ferredoxin reductase</i>	4,06
	PLK2	10769	<i>Polo-like kinase 2</i>	4,32
15	IL1A	3552	<i>Interleukin 1, alpha</i>	3,59
	CXCL2	2920	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	3,52
	ULK4	54986	<i>Unc-51-like kinase 4</i>	4,14
	IFI27	3429	<i>Interferon, alpha-inducible protein 27</i>	3,23
20	IL8	3576	<i>Interleukin 8</i>	3,18
	CDGAP	57514	<i>Cdc42 GTPase-activating protein</i>	3,1
	JARID2	3720	<i>Jumonji, AT rich interactive domain 2</i>	3,36
	THBS1	7057	<i>Thrombospondin 1</i>	3,26
25	DIRAS3	9077	<i>DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3</i>	3,17
	DOT1L	84444	<i>DOT1-like, histone H3 methyltransferase</i>	3,17
	PHLDA2	7262	<i>Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2</i>	2,71
	PCNA	5111	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	3,16
30	CD163	9332	<i>CD163 molecule</i>	2,71
	FAM135A	57579	<i>Family with sequence similarity 135, member A</i>	2,93
	CCL7	6354	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 7</i>	2,5
	TMEM88	92162	<i>Transmembrane protein 88</i>	2,42
35	PARP16	54956	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family member 16</i>	3,84
	MYO5B	4645	<i>Myosin VB</i>	2,58
	CDC42EP3	10602	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3</i>	2,60
40	NOL7	51406	<i>Nucleolar protein 7, 27kDa</i>	2,38
	PCDH12	51294	<i>Protocadherin 12</i>	2,71
	HIST1H2BD	3017	<i>Histone cluster 2, H2bd</i>	2,60
	RRAD	6236	<i>Ras-related associated</i>	2,49
45	AICDA	57379	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>	2,25
	ETS2	2114	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>	2,28
	JHDM1D	80853	<i>Jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D</i>	2,27
50	HIST2H2BE	8349	<i>Histone cluster 2, H2be</i>	2,27
	RCP9	27297	<i>Calcitonin gene-related peptide-receptor component protein</i>	2,66
	PAQR6	79957	<i>Progesterin and adipoQ receptor family member VI</i>	2,17
55	CCNL1	57018	<i>Cyclin L1</i>	2,09
	RAPGEF6	51735	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6</i>	2,13
	PMAIP1	5366	<i>Phorbol-12myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	2,10
	PICALM	8301	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>	2,44
60	RBM16	22828	<i>RNA binding motif protein 16</i>	2,38
	PSMC2	5701	<i>Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2</i>	2,17
	POLH	5429	<i>Polymerase (DNA directed), eta</i>	2,40

65

<sup>a</sup> valores referidos a la expresión en las DCs no irradiadas.

## ES 2 366 323 A1

TABLA 2

*Genes cuya expresión disminuye en DCs irradiadas vs DCs no irradiadas*

Símbolo del Gen	Acceso al GeneID	Nombre del gen	<sup>a</sup> veces de inducción (log 2)
TFEC	22797	<i>Transcription factor EC</i>	-2,11
PPFIBP2	8495	<i>PTPRF interacting protein, protein binding 2</i>	-2,37
LUC7L2	51631	<i>LUC7-like 2 (S. cerevisiae)</i>	-2,58
IFIT1	3434	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	-2,01
WDR67	93594	<i>WD repeat domain 67</i>	-2,59
INPP5A	3632	<i>Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa</i>	-2,04
TNS	7145	<i>Tensin 1</i>	-2,08
ICOSL	23308	<i>Inducible T-cell co-stimulator ligand</i>	-2,63
MYLK3	91807	<i>Myosin light chain kinase 3</i>	-2,66
CTBP2	1488	<i>C-terminal binding protein 2</i>	-2,17
SFRS3	6428	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 3</i>	-2,16
TTC39B	158219	<i>Tetratricopeptide repeat domain 39B</i>	-2,44
RNGTT	8732	<i>RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase</i>	-2,24
FNDC3B	64778	<i>Fibronectin type III domain containing 3B</i>	-2,31
HNRPLL	92906	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like</i>	-2,39
MITF	4286	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>	-2,26
TBC1D9	23158	<i>TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)</i>	-2,26
WWOX	51741	<i>WW domain containing oxidoreductase</i>	-2,86
CAB39	51719	<i>Calcium binding protein 39</i>	-2,46
RASGRP1	10125	<i>RAS guanyl releasing protein 1</i>	-2,50
TAOK3	51347	<i>TAO kinase 3</i>	-2,54
UBE3A	7337	<i>Ubiquitin protein ligase E3A</i>	-3,31
TRIM9	114088	<i>Tripartite motif-containing 9</i>	-3,03
HIVEP2	3097	<i>Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein</i>	-4,35

<sup>a</sup> valores referidos a la expresión en DCs no irradiadas.

## ES 2 366 323 A1

TABLA 3

*Secuencias y número de las sondas TaqMan usadas en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Gen	Cebadores	Sonda
IL10	SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10	30
GADD45A	SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12	19
GADD45B	SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14	10
LSGAL1	SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16	64
LGALS3	SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18	3
POLH	SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20	63
ICOSLG	SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22	26
ETS2	SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24	20
CCL7	SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26	84
IL1A	SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28	6
CD163	SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30	50
IFI27	SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32	41
PLK2	SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34	48
FDXR	SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36	21
IL1B	SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38	78
GDF15	SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40	28
THBS1	SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42	56
CXCL2	SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44	69
CXCR4	SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46	55
PCNA	SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48	69
SOCS1	SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50	87
PTPRE	SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52	6
MITF	SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54	34
CCR7	SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56	77
SLA	SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58	25
IL12A	SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60	50

Ejemplo 2

*Cambios en la expresión de otros genes*

5 Además del programa WebGestalt para agrupamiento de genes, se realizaron análisis utilizando el Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). El GSEA es un método que evalúa los datos de los microarrays a nivel de grupos de genes. Los grupos de genes examinados por el GSEA incluyen vías canónicas de señalización, metabólicas, así como grupos de genes previamente descritos y validados, que son inducidos o suprimidos en respuesta a un estímulo particular. El objetivo del GSEA es determinar si los miembros de un *grupo A* de genes tienden a ocurrir en el extremo superior o inferior de una lista de genes analizados por microarrays, y ordenados por la estadística utilizada en el análisis de expresión diferencial (*lista B*), en este caso el grupo A está correlacionado con una distinción de clase fenotípica. El análisis de GSEA nos permite detectar la regulación de grupos de genes, incluyendo genes no detectados en el primer análisis estadístico debido a la astringencia del proceso de selección. La Tabla 4 muestra algunos de los grupos de genes que aparecen enriquecidos en nuestro sistema (FDR  $q < 0,05$ ). Los datos demuestran que las DCs humanas UVA/UVB irradiadas están enriquecidas con diversos grupos de genes modulados (inducidos o suprimidos) por la radiación UV en queratinocitos y fibroblastos (Tabla 4). Como se esperaba, las DCs irradiadas se encontraron enriquecidas para grupos de genes involucrados en estrés oxidativo, inflamación y señalización de p53. Además el GSEA mostró que varios de los genes que aumentaron en las DCs UVA/UVB irradiadas aumentan también en DCs estimuladas con LPS durante 8 hr (Tabla 4A). Por otro lado, los genes que disminuyen por la radiación en DCs están enriquecidos en diversos grupos de genes involucrados en quimiotaxis, señalización de integrinas y transporte vesicular (Tabla 4B).

25 (Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 366 323 A1

TABLA 4

*Grupos de genes enriquecidos por la irradiación UVA/UVB en DCs humanas de acuerdo al GSEA*

5

### A. Grupos de genes (aumentados).

10

Nombre del grupo de genes	Descripción
BLEO_HUMAN_LYMP_HIGH_4HRS_UP	Aumentados 4 hrs después del tratamiento de linfocitos humanos con dosis altas de bleomicina
UVB_NHEK1-C2	Aumentados por la luz UVB en queratinocitos epidérmicos humanos normales.
HINATA_NFKB_UP	Genes aumentados por NF-kappa B
OXSTRESS_BREASTCA_UP	Aumentados por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Menadiona y t-BH en células de cáncer mamario.
NAKAJIMA_MCS_UP	Aumentados en mastocitos activados humanos y murinos
YANG_OSTEOCLAST_SIG	Genes asociados a osteoclastos, quimiocinas y receptors de quimiocinas
LINDSTEDT_DEND_8H VS_48H_UP	Genes aumentados en DCs estimuladas for 8 h con LPS con DCs estimuladas por 48 hr.
CYTOKINEPATHWAY	BioCarta
TNFA_NFKB_DEP_UP	Aumentados en respuesta a TNF-alpha.
EGF_HDMEC_UP	Aumentados en células endoteliales dermales humanas estimuladas con EGF
INFLAMPATHWAY	BioCarta
HOHENKIRK_MONOCYTE_DEN_DN	Disminuidos en DCs derivadas de monocitos.
P53GENES_ALL	Dianas de p53
IL1RPATHWAY	BioCarta
DCPATHWAY	BioCarta

40

### B. Grupos de genes (inhibidos).

45

Gene Set Name	Description
UVB_NHEK1_C6	Inhibidos por UVB en queratinocitos epidérmicos humanos normales
SIG_CHEMOTAXIS	Genes relacionados con quimiotáxis
UVC_TTD-XPCS_COMMON DN	Disminuidos después del tratamiento de fibroblastos con UVC 3 J/cm <sup>2</sup>
MRNA_PROCESSING	Genes involucrados en el procesamiento de RNA
BYSTROM_IL5_DN	Genes inhibidos en médula ósea de ratón en respuesta a IL-5
BRENTANI_TRANSPORT_OF_VESICLES	Genes relacionados con cáncer involucrados en el transporte vesicular.
ST_INTEGRIN_SIGNALING PATHWAY	BioCarta

65

## Ejemplo 3

*Expresión diferencial de genes en DCs humanas, comparación con queratinocitos y melanocitos humanos*

5 Para identificar genes regulados específicamente en las DCs en respuesta a la irradiación UV, se añadieron 11 genes a los testados por RT-PCR: (IL-10, GADD45A, GADD45B, Galectin-1, Galectin-3, SLA, CXCR4, SOCS1, PTPRE, CCR7 e IL-12A) (Tabla 3), para ser comparados con queratinocitos y melanocitos humanos irradiados. Algunos de estos genes fueron modulados en las DCs en respuesta a la irradiación UV aunque con una  $p > 0,05$  (PTPRE, SLA y GADD45 A y B), mientras que otros fueron señalados por el análisis de GSEA. Todos los genes fueron elegidos  
10 principalmente por su papel como posibles inmunomoduladores. La regulación de este grupo de 24 genes en respuesta a la irradiación UV se estudió en DCs de 6 donantes diferentes y se comparó con melanocitos y queratinocitos humanos primarios. Los 24 genes se clasificaron en 3 grupos funcionales: i) genes que codifican para citoquinas y receptores de quimiocinas (Fig. 2A); ii) genes relacionados con el daño a DNA y respuesta a p53 (Fig. 2B); y iii) genes potencialmente involucrados en inmunomodulación (Fig. 2C). El gen GADD45A diana de p53 fue incluido en el grupo de genes  
15 inmunoreguladores debido a la evidencia creciente de su función en el sistema inmune (Salvador *et al.* 2005. *Nat Immunol* 6:396-402).

En respuesta a la irradiación UV tanto las DCs como los queratinocitos humanos mostraron inducción en la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (IL-12A, IL-1A, IL-B) (Fig. 2A). Sin embargo, mientras que las DCs mostraron la supresión de CCR7 y la inducción de CXCR4 (en consonancia con resultados previos) (Mittelbrunn *et al.* 2005. *J Invest Dermatol* 125:334-342), se observó el resultado opuesto en los queratinocitos (Fig. 2A). La expresión de CCR7 no se detectó en melanocitos, mientras que CXCR4 y CXCL12 resultaron inducidos en éstas células. La expresión de IL-10 fue inducida en las DCs, mientras que no fue detectada en los otros dos tipos celulares.

25 La radiación UV produce una variedad de lesiones en el DNA y otros blancos celulares, disparando patrones complejos de respuesta a estrés (Halliday *et al.* *Mutat Res* 571:107-120). Como se esperaba, la expresión de diversos genes involucrados en estos procesos aumentó en los 3 tipos celulares aunque en diferente extensión, por ejemplo FDXR, PCNA, PLK2 y GADD45a (Fig. 2B y 2C). La regulación de otros genes fue específica de tipo celular: La expresión de POLH aumentó en DCs humanas, pero no en queratinocitos y melanocitos tratados de forma idéntica; la  
30 expresión de MITF disminuyó en DCs y queratinocitos, mientras que mostró un aumento en los melanocitos.

La mayor concentración de genes regulados específicamente de acuerdo al tipo celular, se observó entre los genes inmunomoduladores (Fig. 2C). El gen que codifica para la proteína tirosina fosfoatasa Epsilon (PTPRE), fue suprimida en las DCs, pero inducida en los queratinocitos. SLA fue también suprimida en las DCs, mientras que no fue detectada en los melanocitos bajo nuestras condiciones experimentales. Aunque la expresión de SLA disminuyó en los queratinocitos, debe mencionarse que su expresión en estas células es mucho menor comparado con las DCs humanas (datos no mostrados).

Otros genes que muestran un patrón de expresión diferencial claro en DCs comparado con los melanocitos o queratinocitos incluyen supresor of cytokine signalling (SOCS1), un miembro de la familia de inhibidores STAT (Elliott *et al.* 2004. *Trends Immunol* 25:434-440). SOCS1 fue suprimida en DCs y queratinocitos expuestos a la irradiación UV, pero inducida en los melanocitos (Fig. 2C). Trombospondina-1 (THBS1) es un factor antiangiogénico con propiedades inmunomoduladores importantes (Bornstein. 2001. *J Clin Invest* 107:929-934). En concordancia con estudios previos, los queratinocitos humanos expuestos a radiación UVA/UVB muestran una disminución en la expresión de THBS-1 (Howell *et al.* 2004. *J Dermatol Sci* 34:185-194). Por el contrario, la expresión de THBS-1 por las DCs irradiadas fue incrementada en respuesta a la radiación UV. En lo que respecta a los melanocitos, la expresión de THBS-1 fue muy variable y no mostró un patrón claro de regulación. ICOSL, fue suprimido en las DCs e inducido en los melanocitos. Un patrón similar se observó con las galectinas 1 y 3. Las galectinas han emergido recientemente como nuevos reguladores de la respuesta inflamatoria y la homeostasis de las células inmunes (Rabinovich *et al.* 2007. *Scand J Immunol* 66:143-158). La radiación UVA/UVB indujo una disminución en la expresión de Gal-1 y Gal-3 en las DCs humanas, mientras que su expresión fue inducida en los melanocitos (Fig. 2C). Finalmente, la radiación UV indujo un claro aumento en la expresión de el gen GADD45a en los tres tipos celulares (Fig. 2C).

## Ejemplo 4

*Expresión a nivel de proteína de genes expresados diferencialmente en las DCs en respuesta a la irradiación UV*

El resultado funcional de la alteración en la expresión génica resulta de cambios en la expresión de proteínas. Sin embargo, la expresión proteica no puede predecirse siempre a partir de cambios en los niveles de mRNA. Por otro lado, los genes expresados diferencialmente han sido muy poco estudiados en las DCs. Por lo anterior se corroboraron los resultados de RT-PCR a nivel de proteína mediante western blot en lisados totales de DCs. En la Fig. 3A se muestra un western blot representativo de las proteínas codificadas por genes regulados en las DCs en respuesta a la radiación UVA/UVB. La cuantificación de los cambios en la expresión en relación a las células no tratadas se muestra en la Fig. 3B. En concordancia con los datos de RT-PCR, la radiación UV indujo en las DCs una disminución en la expresión de galectina-1, galectina-3, SLA, PTPRE, ICOSL y SOCS1 a nivel de proteína, y un aumento en la expresión de las proteínas GADD45a y THBS-1. Como controles, la expresión de diversas proteínas fue además determinada en melanocitos y queratinocitos humanos (Fig. 3C). Estos experimentos confirman la ausencia de SLA

en los melanocitos, así como el aumento de galectina-3 previamente descrito. También observamos la disminución en la expresión de THBS-1 en los queratinocitos descrita por otros autores.

## 5 Ejemplo 5

### *La radiación UV modifica la expresión en membrana de la galectin-1 y la galectina-3*

Las galectinas están presentes a nivel intracelular y extracelular, y ejercen sus funciones tanto dentro como fuera de la célula. Aunque las galectinas tienen características de proteínas citosólicas, son secretadas por una vía no clásica y extracelularmente pueden unirse a glycoconjugados en la superficie celular (Rabinovich *et al.* 2007. Scand J Immunol 66:143-158). Por lo anterior, decidimos estudiar si los resultados de western blot y RT-PCR se correspondían con la expresión de las galectinas en la superficie de la membrana de DCs. La expresión de galectin-1 y 3 se determinó mediante citometría de flujo en DCs expuestas o no a irradiación UV. Los resultados muestran que contrario a lo obtenido en los ensayos de RT-PCR y western blot, la expresión a nivel de membrana de ambas proteínas se encuentra aumentada en respuesta a la irradiación UV (Fig. 4A), mientras que su expresión no se modifica o incluso disminuye en respuesta un estímulo inflamatorio potente como el LPS (Fig. 4B). Finalmente el papel de la galectina-3 fue estudiado en ensayos de reacción mixta linfocitaria (MLR). Las células dendríticas se incubaron con células T CD4+ alogénicas en presencia de anti-galectin-3, después de 5 días de cultivo se determinó la proliferación y producción de citoquinas. El bloqueo de galectina-3 resultó en un aumento en la producción de IFN-gamma así como en un ligero aumento de la proliferación de linfocito T CD4+ (Fig. 4C y datos no mostrados).

## Material y Métodos empleados

25

### *Obtención de Células Dendríticas derivadas de Monocitos, Queratinocitos y Melanocitos*

El estudio se realizó de acuerdo a los principios de Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Básica local. Se obtuvo consentimiento informado de todos los voluntarios.

30

Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas a partir de donantes sanos mediante separación por gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) de acuerdo a procedimientos estándar. Los monocitos se purificaron mediante un pase de adhesión durante 30 min a 37°C en medio de cultivo (RPMI) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF). Los monocitos adheridos fueron inmediatamente sometidos al protocolo de diferenciación de Células Dendríticas. Brevemente, los monocitos se cultivaron en RPMI con 10% de SBF, IL-4 (10 ng/ml R&D Systems Inc, Minneapolis, MN USA) y GM-CSF (500 U/ml, Peprotech, London UK). Las células se cultivaron durante 5 días y suplementadas con citoquinas cada 48 hrs para obtener células dendríticas inmaduras. Las características fenotípicas de éstas células fueron analizadas mediante citometría de flujo al día 5 (HLA-DR+, CD1a+, CD209+, CD14-).

40

Los queratinocitos humanos fueron obtenidos de piel normal (prepucio, abdomen o cuero cabelludo). Brevemente, las muestras de piel se incubaron toda la noche a 4°C en presencia de dispasa en solución de buffer fosfatos, para facilitar la separación de epidermis y dermis. Para obtener células aisladas, la epidermis se incubó en presencia de tripsina durante 20 min. Las células epidérmicas se cultivaron en medio de crecimiento de queratinocitos (Defined keratinocyte- SFM, Gibco). El medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. Los melanocitos humanos se obtuvieron a partir de epidermis de prepucio y fueron cultivados en medio 254CF para melanocitos (Cascade Biologicals, Portland, OR USA). Los cultivos de queratinocitos y melanocitos fueron divididos un máximo de 4 veces, los experimentos fueron llevados a cabo con cultivos al 60-80% de confluencia.

50

### *Radiación Ultravioleta con Simulador Solar*

Se utilizó un simulador solar de 1000 watt de arco de xenón, (Oriol, USA) equipado con un filtro Oriol 81017 ("Colipa"). Las medidas de irradiación UVA y UVB se realizaron diariamente con un radiómetro IL-1700 (International Light, USA) equipado con foto-detectores SED240/UVB-1/TD y SED033/UVA/TD. El radiómetro se calibró con un espectro-radiómetro Solar-Scope (Solatell, UK).

55

Las Células Dendríticas, queratinocitos y melanocitos humanos (3x10<sup>6</sup> cel/0,75 ml de solución balanceada de Hanks) se irradiaron con 3,7 J/cm<sup>2</sup> UVA + 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB. Inmediatamente después de la irradiación las células fueron cultivadas en sus respectivos medios de cultivo durante 6 hr, y subsecuentemente procesadas para la extracción de RNA. El RNA total se extrajo utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen).

60

### *Hibridación de los microarrays y detección de la señal*

65

El RNA total de cada muestra fue procesado e hibridado independientemente en bioarrays de genoma total humano (CodeLink, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Las hibridaciones se realizaron de acuerdo a las recomenda-

## ES 2 366 323 A1

ciones del fabricante. Los arrays fueron escaneados en un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments), la imagen fue procesada con el programa informático de análisis de expresión de CodeLink.

### 5 *Análisis estadístico de los microarrays*

Los valores de intensidad crudos se normalizaron mediante el método de cuantiles implementado en el paquete Limma Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Los datos de cada set de experimental (DCs no-irradiadas y DCs UV-irradiadas) se filtraron de acuerdo a los siguientes pasos: 1) Solamente los genes con dos o 3 spots de calidad asignados como G (*good*), o L (*low*) se seleccionaron para el subsecuente análisis; 2) Para los genes con solo dos spots de calidad, el tercero fue asignado como la media de éstos dos; 3) A los valores por debajo de 0 se les asignó un valor de 10, Después de completar los procedimientos de filtrado indicados, los datos fueron asignados a los grupos experimentales: DCs no irradiadas vs DCs UV-irradiadas. Los valores de “p” fueron ajustados por la prueba de hipótesis múltiples utilizando el procedimiento “step-down false-discovery rate” de Benjamini-Hochberg implementado en el paquete multi-test Bioconductor. Los genes con una valor de  $p < 0,05$  se consideraron diferencialmente expresados.

### *RT-PCR semicuantitativa*

Los cambios en los genes seleccionados a partir de los resultados de los microarrays se comprobaron mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan (Universal Human Probe Roche library). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 3 y fueron diseñados con el programa informático de Roche para PCR a tiempo real y se obtuvieron de OPERON Biotechnologies (Cologne, Germany). Los niveles de expresión se normalizaron contra el gen 18x (cat. Hs99999901\_s1, de Applied Biosystems).

### *Western blot*

Después de la irradiación UV las células se cultivaron durante 24 hrs y posteriormente fueron lisadas en una solución de NP40 1%, deoxicolato 0,5% y SDS al 0,1%. Los extractos proteicos fueron cargados en geles poliacrilamida (SDS-PAGE) del 12% (Gal-1, Gal-3, SLA, PTPRE, ICOSL, SOCS1 y GADD45a) o del 8% (THBS-1). Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos y sus correspondientes anticuerpos secundarios.

### *Análisis de agrupamiento de Genes y GSEA*

Los genes fueron agrupados de acuerdo a su función utilizando el WEB-base Gene Set Análisis Toolkit (WebGestalt) <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>. El Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) es un método informático que determina si un grupo definido de genes muestra diferencias significativas en su expresión entre dos estados biológicos.

# ES 2 366 323 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel, que comprende:

- a. obtener células dendríticas y/o células de Langerhans aisladas;
- b. incubar las células del paso (a) con el compuesto o la mezcla de compuestos;
- 10 d. detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*, en las células del paso (b), y
- 15 e. comparar la cantidad del producto detectada en el paso (d) con una cantidad de referencia en un control, y
- f. asignar un efecto inmunomodulador al compuesto o mezcla de compuestos a una diferencia significativa observada en la comparación del paso (e).

20 2. Método según la reivindicación 1, que además comprende entre los pasos (b) y (d):

- c. irradiar con radiación ultravioleta (UV) las células del paso (b).

25 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde en el paso (d) se detecta la cantidad del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* y *GADD45A*.

30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el efecto inmunomodulador es un efecto inductor de tolerancia inmunológica.

5. Método según la reivindicación 4 donde el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- 35 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de, al menos, uno de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCS1* significativamente menor que la cantidad de referencia del control o
- 40 ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

6. Método según la reivindicación 5 donde el efecto inductor de tolerancia inmunológica se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- 45 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* y *SOCS1* significativamente menor que la cantidad de referencia del control y
- 50 ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* y *GADD45A* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 donde el efecto inmunomodulador es un efecto fotoprotector de rayos UV.

55 8. Método según la reivindicación 7 donde el efecto fotoprotector de rayos UV se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

- 60 i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de, al menos, uno de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* o *SOCS1* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control o
- ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes *THBS1* o *GADD45A* significativamente menor que la cantidad de referencia del control.

65 9. Método según la reivindicación 8 donde el efecto fotoprotector de rayos UV se asigna si la diferencia significativa del paso (f) es:

## ES 2 366 323 A1

i) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA* y *SOCS1* significativamente mayor que la cantidad de referencia del control, y

ii) una cantidad detectada en el paso (d) del producto de la expresión de los genes *THBS1* y *GADD45A* significativamente menor que la cantidad de referencia del control.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la radiación UV es radiación UVA y/o UVB.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el producto de expresión de los genes es el RNAm.

12. Método según la reivindicación 11 donde el RNAm se detecta mediante un *microarray* de ácidos nucleicos.

13. Método según la reivindicación 11 donde el RNAm se detecta mediante RT-PCR.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el producto de expresión de los genes es la proteína.

15. Método según la reivindicación 14 donde la proteína se detecta en un extracto de células totales.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 donde la proteína se detecta mediante *western-blot*.

17. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende cebadores, sondas, y/o anticuerpos para la detección del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* o *GADD45A*.

18. Kit según la reivindicación 17 que comprende cebadores, sondas, y/o anticuerpos para la detección del producto de la expresión de los genes *PTPRE*, *ICOSL*, *Gal-1*, *Gal-3*, *SLA*, *SOCS1*, *THBS1* y *GADD45A*.

FIG. 1

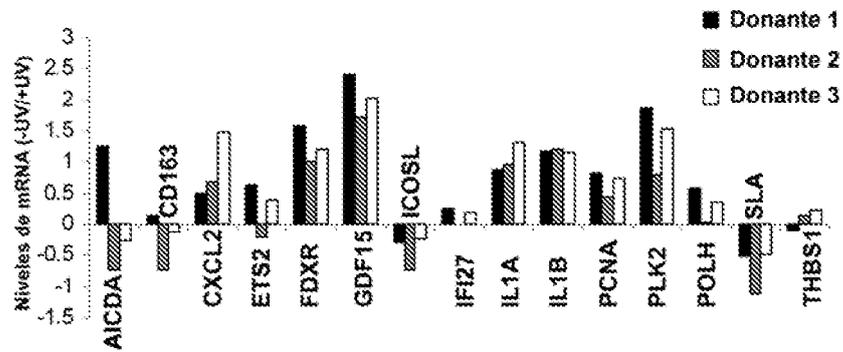
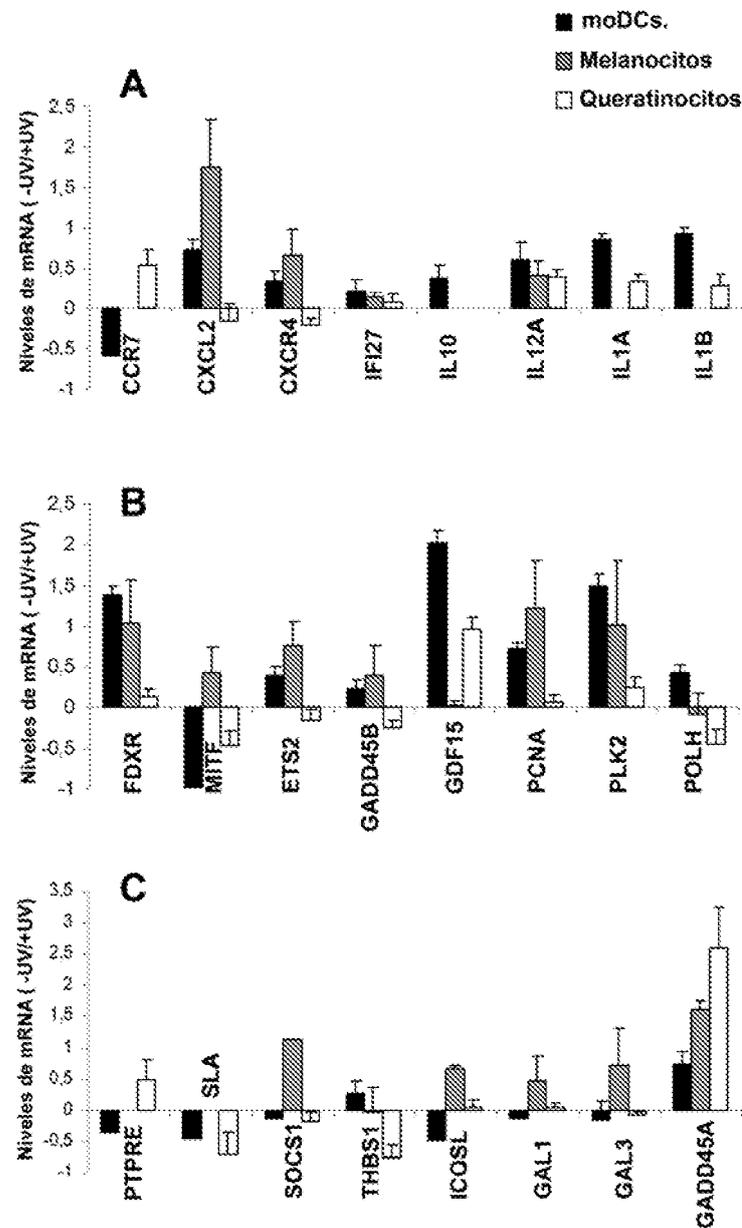
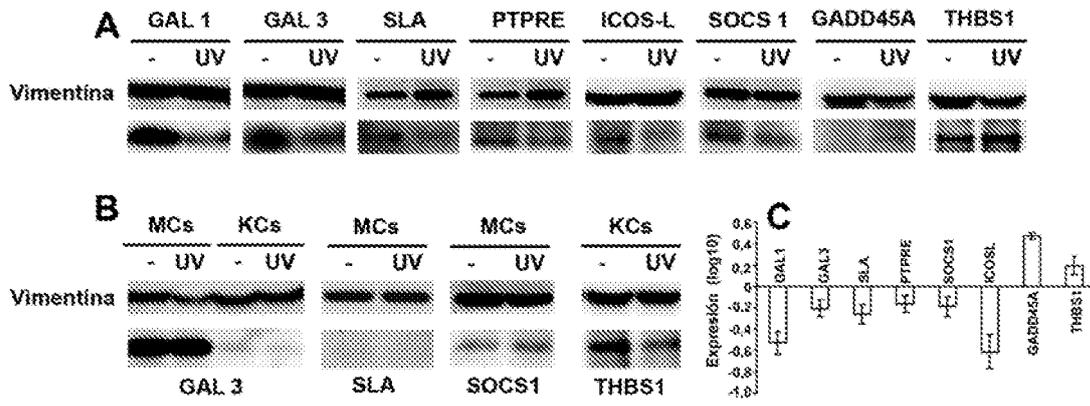


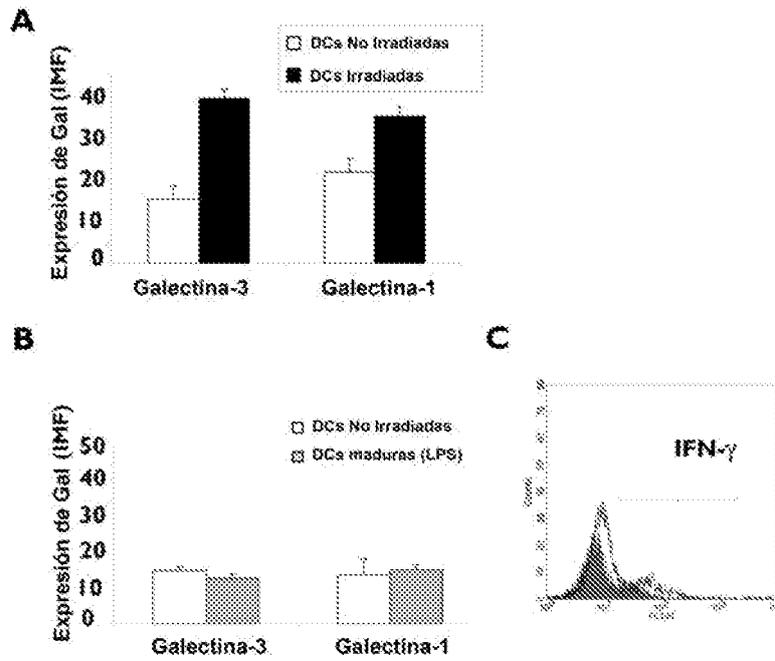
FIG. 2



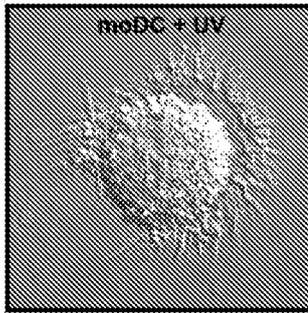
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**

<p><b>Metabolismo ADN, ARN</b></p> <p>HIST1H2BD HIST2H2BE DOT1L POLH* PCNA* GADD45A* <b>SFR3</b> <b>RNGTT</b> <b>HNRPLL</b> <b>PPFIBP2</b> <b>LUCL7L2</b></p>	<p><b>Diferenciación Celular</b></p> <p>ETS2* <b>MITF*</b></p>	<p><b>Citoesqueleto, Adhesión y Migración</b></p> <p>MYO5B CDC42EP3 PCDH12 CXCR4* <b>TNS</b> <b>MLCK3</b> <b>CCR7*</b></p>
<p><b>Procesos Sistema Inmune</b></p> <p>IFI27* GADD45A* GADD45B* THBS1* GDF15* <b>SLA*</b> <b>PTPRE*</b> <b>ICOSL*</b> <b>GAL1*</b> <b>GAL3*</b> <b>GAL7*</b></p>	<p>moDC + UV</p> 	<p><b>Respuesta a Estrés</b></p> <p>GADD45A* GADD45B* PCNA* POLH* PMAIP THBS*</p>
	<p><b>Muerte y Ciclo Celular</b></p> <p>DIRAS3 CCNL1 PLK2* PHLDA2 FDXR <b>WOXX</b></p>	<p><b>Respuesta Inflamatoria</b></p> <p>CXCL2* IL1A* IL1B* CCL7 IL8</p>

# ES 2 366 323 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)  
Universidad Autónoma de Madrid (UAM)

5

<120> Método de identificación de compuestos inmunomoduladores para la piel

<130> ES1997.3

10

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 642

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met Ser Asn Arg Ser Ser Phe Ser Arg Leu Thr Trp Phe Arg Lys Gln  
1 5 10 15

30

Arg Lys Ala Val Val Ser Thr Ser Asp Lys Lys Met Pro Asn Gly Ile  
20 25 30

Leu Glu Glu Gln Glu Gln Gln Arg Val Met Leu Leu Ser Arg Ser Pro  
35 40 45

35

Ser Gly Pro Lys Lys Tyr Phe Pro Ile Pro Val Glu His Leu Glu Glu  
50 55 60

40

Glu Ile Arg Ile Arg Ser Ala Asp Asp Cys Lys Gln Phe Arg Glu Glu  
65 70 75 80

Phe Asn Ser Leu Pro Ser Gly His Ile Gln Gly Thr Phe Glu Leu Ala  
85 90 95

45

Asn Lys Glu Glu Asn Arg Glu Lys Asn Arg Tyr Pro Asn Ile Leu Pro  
100 105 110

50

Asn Asp His Ser Arg Val Ile Leu Ser Gln Leu Asp Gly Ile Pro Cys  
115 120 125

55

Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Asp Gly Tyr Lys Glu Lys Asn  
130 135 140

60

Lys Phe Ile Ala Ala Gln Gly Pro Lys Gln Glu Thr Val Asn Asp Phe  
145 150 155 160

Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Lys Ser Ala Thr Ile Val Met Leu Thr  
165 170 175

Asn Leu Lys Glu Arg Lys Glu Glu Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Asp

65

# ES 2 366 323 A1

	180	185	190
5	Gln Gly Cys 195	Trp Thr Tyr Gly Asn 200	Ile Arg Val Cys Val 205
10	Val Val 210	Leu Val Asp Tyr Thr 215	Ile Arg Lys Phe Cys 220
15	Leu Pro Asp Gly Cys 225	Lys Ala Pro Arg Leu 230	Val Ser Gln Leu His 235
20	Thr Ser Trp Pro Asp 245	Phe Gly Val Pro Phe 250	Thr Pro Ile Gly Met 255
25	Lys Phe Leu Lys 260	Lys Val Lys Thr Leu 265	Asn Pro Val His Ala 270
30	Ile Val Val 275	His Cys Ser Ala Gly 280	Val Gly Arg Thr Gly 285
35	Val Ile Asp Ala Met 290	Met Met Ala Met 295	Met His Ala Glu 300
40	Val Phe Glu Phe Val 305	Ser Arg Ile Arg Asn 310	Gln Arg Pro Gln Met 315
45	Gln Thr Asp Met Gln 325	Tyr Thr Phe Ile Tyr 330	Gln Ala Leu Leu Glu 335
50	Tyr Leu Tyr Gly 340	Asp Thr Glu Leu Asp 345	Val Ser Ser Leu Glu 350
55	Leu Gln Thr Met His 355	Gly Thr Thr Thr His 360	Phe Asp Lys Ile Gly 365
60	Glu Glu Glu Phe Arg 370	Lys Leu Thr Asn Val 375	Arg Ile Met Lys Glu 380
65	Met Arg Thr Gly Asn 385	Leu Pro Ala Asn Met 390	Lys Lys Ala Arg Val 395
70	Gln Ile Ile Pro Tyr 405	Asp Phe Asn Arg Val 410	Ile Leu Ser Met Lys 415
75	Gly Gln Glu Tyr 420	Thr Asp Tyr Ile Asn 425	Ala Ser Phe Ile Asp 430
80	Arg Gln Lys Asp Tyr 435	Phe Ile Ala Thr 440	Gln Gly Pro Leu 445
85			Ala His Thr

## ES 2 366 323 A1

Val Glu Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Trp Lys Ser His Thr Ile  
 450 455 460

5 Val Met Leu Thr Glu Val Gln Glu Arg Glu Gln Asp Lys Cys Tyr Gln  
 465 470 475 480

10 Tyr Trp Pro Thr Glu Gly Ser Val Thr His Gly Glu Ile Thr Ile Glu  
 485 490 495

15 Ile Lys Asn Asp Thr Leu Ser Glu Ala Ile Ser Ile Arg Asp Phe Leu  
 500 505 510

20 Val Thr Leu Asn Gln Pro Gln Ala Arg Gln Glu Glu Gln Val Arg Val  
 515 520 525

25 Val Arg Gln Phe His Phe His Gly Trp Pro Glu Ile Gly Ile Pro Ala  
 530 535 540

30 Glu Gly Lys Gly Met Ile Asp Leu Ile Ala Ala Val Gln Lys Gln Gln  
 545 550 555 560

35 Gln Gln Thr Gly Asn His Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Ala  
 565 570 575

40 Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Leu Ser Asn Ile Leu Glu Arg Val  
 580 585 590

45 Lys Ala Glu Gly Leu Leu Asp Val Phe Gln Ala Val Lys Ser Leu Arg  
 595 600 605

50 Leu Gln Arg Pro His Met Val Gln Thr Leu Glu Gln Tyr Glu Phe Cys  
 610 615 620

55 Tyr Lys Val Val Gln Asp Phe Ile Asp Ile Phe Ser Asp Tyr Ala Asn  
 625 630 635 640

Phe Lys

60 <210> 2  
 <211> 302  
 55 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

65 <400> 2

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu  
 1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp  
 20 25 30

## ES 2 366 323 A1

	Val	Glu	Leu 35	Ser	Cys	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Phe 45	Asp	Leu	Asn
5	Asp	Val 50	Tyr	Val	Tyr	Trp	Gln 55	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys 60	Thr	Val	Val	Thr
10	Tyr 65	His	Ile	Pro	Gln	Asn 70	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn 75	Val	Asp	Ser	Arg	Tyr 80
15	Arg	Asn	Arg	Ala	Leu 85	Met	Ser	Pro	Ala	Gly 90	Met	Leu	Arg	Gly	Asp 95	Phe
20	Ser	Leu	Arg	Leu 100	Phe	Asn	Val	Thr	Pro 105	Gln	Asp	Glu	Gln	Lys 110	Phe	His
25	Cys	Leu	Val 115	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu 120	Gly	Phe	Gln	Glu	Val 125	Leu	Ser	Val
30	Glu	Val 130	Thr	Leu	His	Val	Ala 135	Ala	Asn	Phe	Ser	Val 140	Pro	Val	Val	Ser
35	Ala 145	Pro	His	Ser	Pro	Ser 150	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr 155	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser 160
40	Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro 165	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr 170	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr 175	Asp
45	Asn	Ser	Leu	Leu 180	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln 185	Asn	Asp	Thr	Val	Phe 190	Leu	Asn
50	Met	Arg	Gly 195	Leu	Tyr	Asp	Val	Val 200	Ser	Val	Leu	Arg	Ile 205	Ala	Arg	Thr
55	Pro	Ser	Val	Asn	Ile	Gly	Cys 215	Cys	Ile	Glu	Asn 220	Val	Leu	Leu	Gln	Gln
60	Asn 225	Leu	Thr	Val	Gly	Ser 230	Gln	Thr	Gly	Asn	Asp 235	Ile	Gly	Glu	Arg	Asp 240
65	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn 245	Pro	Val	Ser	Thr	Gly 250	Glu	Lys	Asn	Ala	Ala 255	Thr
70	Trp	Ser	Ile	Leu 260	Ala	Val	Leu	Cys	Leu 265	Leu	Val	Val	Val	Ala 270	Val	Ala
75	Ile	Gly	Trp 275	Val	Cys	Arg	Asp	Arg 280	Cys	Leu	Gln	His	Ser 285	Tyr	Ala	Gly
80	Ala	Trp 290	Ala	Val	Ser	Pro	Glu 295	Thr	Glu	Leu	Thr	Gly 300	His	Val		

ES 2 366 323 A1

<210> 3

<211> 135

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

10 Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

15 Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val  
20 25 30

20 Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro  
35 40 45

25 Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys  
50 55 60

30 Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe  
65 70 75 80

35 Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn  
85 90 95

40 Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg  
100 105 110

45 Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys  
115 120 125

Ile Lys Cys Val Ala Phe Asp  
130 135

<210> 4

<211> 250

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

55 Met Ala Asp Asn Phe Ser Leu His Asp Ala Leu Ser Gly Ser Gly Asn  
1 5 10 15

60 Pro Asn Pro Gln Gly Trp Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Ala Gly  
20 25 30

65 Ala Gly Gly Tyr Pro Gly Ala Ser Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln  
35 40 45

## ES 2 366 323 A1

Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro  
 50 55 60

5  
 Gly Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ala Pro Ala Pro Gly Val Tyr Pro  
 65 70 75 80

10  
 Gly Pro Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Pro Ser Ser Gly Gln Pro Ser  
 85 90 95

15  
 Ala Thr Gly Ala Tyr Pro Ala Thr Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gly  
 100 105 110

20  
 Pro Leu Ile Val Pro Tyr Asn Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Val Pro  
 115 120 125

25  
 Arg Met Leu Ile Thr Ile Leu Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg  
 130 135 140

30  
 Ile Ala Leu Asp Phe Gln Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn  
 145 150 155 160

35  
 Pro Arg Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys  
 165 170 175

40  
 Leu Asp Asn Asn Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Val Phe Pro Phe  
 180 185 190

45  
 Glu Ser Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Pro Asp His  
 195 200 205

50  
 Phe Lys Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg  
 210 215 220

55  
 Val Lys Lys Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile  
 225 230 235 240

60  
 Asp Leu Thr Ser Ala Ser Tyr Thr Met Ile  
 245 250

<210> 5  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

65  
 Met Gly Asn Ser Met Lys Ser Thr Pro Ala Pro Ala Glu Arg Pro Leu  
 1 5 10 15

Pro Asn Pro Glu Gly Leu Asp Ser Asp Phe Leu Ala Val Leu Ser Asp  
 20 25 30

## ES 2 366 323 A1

Tyr Pro Ser Pro Asp Ile Ser Pro Pro Ile Phe Arg Arg Gly Glu Lys  
                   35                                  40                                  45  
 5 Leu Arg Val Ile Ser Asp Glu Gly Gly Trp Trp Lys Ala Ile Ser Leu  
           50                                  55                                  60  
 10 Ser Thr Gly Arg Glu Ser Tyr Ile Pro Gly Ile Cys Val Ala Arg Val  
    65                                  70                                  75                                  80  
 15 Tyr His Gly Trp Leu Phe Glu Gly Leu Gly Arg Asp Lys Ala Glu Glu  
                   85                                  90  
 20 Leu Leu Gln Leu Pro Asp Thr Lys Val Gly Ser Phe Met Ile Arg Glu  
                   100                                  105                                  110  
 25 Ser Glu Thr Lys Lys Gly Phe Tyr Ser Leu Ser Val Arg His Arg Gln  
           115                                  120                                  125  
 30 Val Lys His Tyr Arg Ile Phe Arg Leu Pro Asn Asn Trp Tyr Tyr Ile  
    130                                  135                                  140  
 35 Ser Pro Arg Leu Thr Phe Gln Cys Leu Glu Asp Leu Val Asn His Tyr  
    145                                  150                                  155                                  160  
 40 Ser Glu Val Ala Asp Gly Leu Cys Cys Val Leu Thr Thr Pro Cys Leu  
           165                                  170                                  175  
 45 Thr Gln Ser Thr Ala Ala Pro Ala Val Arg Ala Ser Ser Ser Pro Val  
           180                                  185                                  190  
 50 Thr Leu Arg Gln Lys Thr Val Asp Trp Arg Arg Val Ser Arg Leu Gln  
           195                                  200                                  205  
 55 Glu Asp Pro Glu Gly Thr Glu Asn Pro Leu Gly Val Asp Glu Ser Leu  
    210                                  215                                  220  
 60 Phe Ser Tyr Gly Leu Arg Glu Ser Ile Ala Ser Tyr Leu Ser Leu Thr  
    225                                  230                                  235                                  240  
 Ser Glu Asp Asn Thr Ser Phe Asp Arg Lys Lys Lys Ser Ile Ser Leu  
           245                                  250  
 65 Met Tyr Gly Gly Ser Lys Arg Lys Ser Ser Phe Phe Ser Ser Pro Pro  
           260                                  265                                  270  
 Tyr Phe Glu Asp  
           275

<210> 6

<211> 211

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 366 323 A1

<400> 6

5 Met Val Ala His Asn Gln Val Ala Ala Asp Asn Ala Val Ser Thr Ala  
 1 5 10  
 Ala Glu Pro Arg Arg Arg Pro Glu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 20 20 25 30  
 10 Pro Ala Ala Pro Ala Arg Pro Arg Pro Cys Pro Ala Val Pro Ala Pro  
 35 40 45  
 15 Ala Pro Gly Asp Thr His Phe Arg Thr Phe Arg Ser His Ala Asp Tyr  
 50 55 60  
 20 Arg Arg Ile Thr Arg Ala Ser Ala Leu Leu Asp Ala Cys Gly Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 25 Trp Gly Pro Leu Ser Val His Gly Ala His Glu Arg Leu Arg Ala Glu  
 85 90 95  
 30 Pro Val Gly Thr Phe Leu Val Arg Asp Ser Arg Gln Arg Asn Cys Phe  
 100 105 110  
 35 Phe Ala Leu Ser Val Lys Met Ala Ser Gly Pro Thr Ser Ile Arg Val  
 115 120 125  
 40 His Phe Gln Ala Gly Arg Phe His Leu Asp Gly Ser Arg Glu Ser Phe  
 130 135 140  
 45 Asp Cys Leu Phe Glu Leu Leu Glu His Tyr Val Ala Ala Pro Arg Arg  
 145 150 155 160  
 50 Met Leu Gly Ala Pro Leu Arg Gln Arg Arg Val Arg Pro Leu Gln Glu  
 165 170 175  
 55 Leu Cys Arg Gln Arg Ile Val Ala Thr Val Gly Arg Glu Asn Leu Ala  
 180 185 190  
 60 Arg Ile Pro Leu Asn Pro Val Leu Arg Asp Tyr Leu Ser Ser Phe Pro  
 195 200 205  
 65 Phe Gln Ile  
 210

<210> 7

60 <211> 1170

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 366 323 A1

<400> 7

5	Met Gly Leu Ala Trp Gly Leu Gly Val Leu Phe Leu Met His Val Cys 1 5 10 15
10	Gly Thr Asn Arg Ile Pro Glu Ser Gly Gly Asp Asn Ser Val Phe Asp 20 25 30
15	Ile Phe Glu Leu Thr Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Gly Arg Arg Leu 35 40 45
20	Val Lys Gly Pro Asp Pro Ser Ser Pro Ala Phe Arg Ile Glu Asp Ala 50 55 60
25	Asn Leu Ile Pro Pro Val Pro Asp Asp Lys Phe Gln Asp Leu Val Asp 65 70 75 80
30	Ala Val Arg Ala Glu Lys Gly Phe Leu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Gln 85 90 95
35	Met Lys Lys Thr Arg Gly Thr Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Asp His 100 105 110
40	Ser Gly Gln Val Phe Ser Val Val Ser Asn Gly Lys Ala Gly Thr Leu 115 120 125
45	Asp Leu Ser Leu Thr Val Gln Gly Lys Gln His Val Val Ser Val Glu 130 135 140
50	Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Gln Trp Lys Ser Ile Thr Leu Phe Val 145 150 155 160
55	Gln Glu Asp Arg Ala Gln Leu Tyr Ile Asp Cys Glu Lys Met Glu Asn 165 170 175
60	Ala Glu Leu Asp Val Pro Ile Gln Ser Val Phe Thr Arg Asp Leu Ala 180 185 190
65	Ser Ile Ala Arg Leu Arg Ile Ala Lys Gly Gly Val Asn Asp Asn Phe 195 200 205
70	Gln Gly Val Leu Gln Asn Val Arg Phe Val Phe Gly Thr Thr Pro Glu 210 215 220
75	Asp Ile Leu Arg Asn Lys Gly Cys Ser Ser Ser Thr Ser Val Leu Leu 225 230 235 240
80	Thr Leu Asp Asn Asn Val Val Asn Gly Ser Ser Pro Ala Ile Arg Thr 245 250 255

ES 2 366 323 A1

Asn Tyr Ile Gly His Lys Thr Lys Asp Leu Gln Ala Ile Cys Gly Ile  
 260 265 270  
 5 Ser Cys Asp Glu Leu Ser Ser Met Val Leu Glu Leu Arg Gly Leu Arg  
 275 280 285  
 10 Thr Ile Val Thr Thr Leu Gln Asp Ser Ile Arg Lys Val Thr Glu Glu  
 290 295 300  
 15 Asn Lys Glu Leu Ala Asn Glu Leu Arg Arg Pro Pro Leu Cys Tyr His  
 305 310 315  
 Asn Gly Val Gln Tyr Arg Asn Asn Glu Glu Trp Thr Val Asp Ser Cys  
 325 330 335  
 20 Thr Glu Cys His Cys Gln Asn Ser Val Thr Ile Cys Lys Lys Val Ser  
 340 345 350  
 25 Cys Pro Ile Met Pro Cys Ser Asn Ala Thr Val Pro Asp Gly Glu Cys  
 355 360 365  
 30 Cys Pro Arg Cys Trp Pro Ser Asp Ser Ala Asp Asp Gly Trp Ser Pro  
 370 375 380  
 35 Trp Ser Glu Trp Thr Ser Cys Ser Thr Ser Cys Gly Asn Gly Ile Gln  
 385 390 395 400  
 Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Ser Leu Asn Asn Arg Cys Glu Gly Ser  
 405 410 415  
 40 Ser Val Gln Thr Arg Thr Cys His Ile Gln Glu Cys Asp Lys Arg Phe  
 420 425 430  
 45 Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 50 Val Thr Cys Gly Asp Gly Val Ile Thr Arg Ile Arg Leu Cys Asn Ser  
 450 455 460  
 55 Pro Ser Pro Gln Met Asn Gly Lys Pro Cys Glu Gly Glu Ala Arg Glu  
 465 470 475 480  
 Thr Lys Ala Cys Lys Lys Asp Ala Cys Pro Ile Asn Gly Gly Trp Gly  
 485 490 495  
 60 Pro Trp Ser Pro Trp Asp Ile Cys Ser Val Thr Cys Gly Gly Gly Val  
 500 505 510  
 65 Gln Lys Arg Ser Arg Leu Cys Asn Asn Pro Thr Pro Gln Phe Gly Gly

# ES 2 366 323 A1

	515	520	525
5	Lys Asp Cys Val Gly Asp Val Thr Glu Asn Gln Ile Cys Asn Lys Gln 530 535 540		
10	Asp Cys Pro Ile Asp Gly Cys Leu Ser Asn Pro Cys Phe Ala Gly Val 545 550 555 560		
15	Lys Cys Thr Ser Tyr Pro Asp Gly Ser Trp Lys Cys Gly Ala Cys Pro 565 570 575		
20	Pro Gly Tyr Ser Gly Asn Gly Ile Gln Cys Thr Asp Val Asp Glu Cys 580 585 590		
25	Lys Glu Val Pro Asp Ala Cys Phe Asn His Asn Gly Glu His Arg Cys 595 600 605		
30	Glu Asn Thr Asp Pro Gly Tyr Asn Cys Leu Pro Cys Pro Pro Arg Phe 610 615 620		
35	Thr Gly Ser Gln Pro Phe Gly Gln Gly Val Glu His Ala Thr Ala Asn 625 630 635 640		
40	Lys Gln Val Cys Lys Pro Arg Asn Pro Cys Thr Asp Gly Thr His Asp 645 650 655		
45	Cys Asn Lys Asn Ala Lys Cys Asn Tyr Leu Gly His Tyr Ser Asp Pro 660 665 670		
50	Met Tyr Arg Cys Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Ile Ile 675 680 685		
55	Cys Gly Glu Asp Thr Asp Leu Asp Gly Trp Pro Asn Glu Asn Leu Val 690 695 700		
60	Cys Val Ala Asn Ala Thr Tyr His Cys Lys Lys Asp Asn Cys Pro Asn 705 710 715 720		
65	Leu Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Tyr Asp Lys Asp Gly Ile Gly Asp 725 730 735		
70	Ala Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asn Asp Lys Ile Pro Asp Asp Arg Asp 740 745 750		
75	Asn Cys Pro Phe His Tyr Asn Pro Ala Gln Tyr Asp Tyr Asp Arg Asp 755 760 765		
80	Asp Val Gly Asp Arg Cys Asp Asn Cys Pro Tyr Asn His Asn Pro Asp 770 775 780		

## ES 2 366 323 A1

	Gln	Ala	Asp	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Cys	Ala	Ala	Asp
	785					790					795					800
5	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ile	Leu	Asn	Glu	Arg	Asp	Asn	Cys	Gln	Tyr	Val
					805					810					815	
10	Tyr	Asn	Val	Asp	Gln	Arg	Asp	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Val	Gly	Asp	Gln
				820					825					830		
15	Cys	Asp	Asn	Cys	Pro	Leu	Glu	His	Asn	Pro	Asp	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp
			835					840					845			
20	Ser	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Thr	Cys	Asp	Asn	Asn	Gln	Asp	Ile	Asp	Glu
		850					855					860				
25	Asp	Gly	His	Gln	Asn	Asn	Leu	Asp	Asn	Cys	Pro	Tyr	Val	Pro	Asn	Ala
	865					870					875					880
30	Asn	Gln	Ala	Asp	His	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Gly	Asp	Ala	Cys	Asp	His
					885					890					895	
35	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Gly	Ile	Pro	Asp	Asp	Lys	Asp	Asn	Cys	Arg	Leu
				900					905					910		
40	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp
			915					920					925			
45	Ala	Cys	Lys	Asp	Asp	Phe	Asp	His	Asp	Ser	Val	Pro	Asp	Ile	Asp	Asp
		930					935					940				
50	Ile	Cys	Pro	Glu	Asn	Val	Asp	Ile	Ser	Glu	Thr	Asp	Phe	Arg	Arg	Phe
	945					950					955					960
55	Gln	Met	Ile	Pro	Leu	Asp	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Asp	Pro	Asn
					965					970					975	
60	Trp	Val	Val	Arg	His	Gln	Gly	Lys	Glu	Leu	Val	Gln	Thr	Val	Asn	Cys
				980					985					990		
65	Asp	Pro	Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Tyr	Asp	Glu	Phe	Asn	Ala	Val	Asp	Phe
			995					1000					1005			
70	Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Ile	Asn	Thr	Glu	Arg	Asp	Asp	Asp	Tyr	Ala	
		1010					1015					1020				
75	Gly	Phe	Val	Phe	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Ser	Arg	Phe	Tyr	Val	Val	
		1025					1030					1035				
80	Met	Trp	Lys	Gln	Val	Thr	Gln	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Asn	Pro	Thr	



ES 2 366 323 A1

Arg Leu Ala Glu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Asp Ala Gly Pro Ala Ala  
100 105 110

5 Ser Glu Gly Ala Glu Gln Pro Pro Asp Leu His Cys Val Leu Val Thr  
115 120 125

10 Asn Pro His Ser Ser Gln Trp Lys Asp Pro Ala Leu Ser Gln Leu Ile  
130 135 140

15 Cys Phe Cys Arg Glu Ser Arg Tyr Met Asp Gln Trp Val Pro Val Ile  
145 150 155 160

Asn Leu Pro Glu Arg  
165

20 <210> 9  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
25 <220>  
<223> cebador directo IL-10

30 <400> 9  
tgggggagaa cctgaagac 19

35 <210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
40 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> cebador reverso IL-10

45 <400> 10  
ccttgctctt gtttcacag g 21

50 <210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
55 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> cebador directo GADD45A

60 <400> 11  
ttgcaatatg actttggagg aa 22

65 <210> 12  
<211> 19

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador reverso GADD45A	
	<400> 12	
10	catccccac cttatcat	19
	<210> 13	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador directo GADD45B	
	<400> 13	
25	cattgtctcc tggtcacga	19
	<210> 14	
30	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador reverso GADD45B	
	<400> 14	
40	taggggaccc actggtgt	19
	<210> 15	
45	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador directo LSGAL1	
	<400> 15	
55	agcgggaggc tgtcttc	18
	<210> 16	
60	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> cebador reverso LSGAL1	

## ES 2 366 323 A1

	<400> 16	
	cctggtcgaaggtgatgc	18
5	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo LSGAL3	
15	<400> 17	
	gagcctaccctgccactg	18
20	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso LSGAL3	
30	<400> 18	
	aggcaaaggcaggtataag g	21
35	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo POLH	
45	<400> 19	
	tgcattfactgtcatcaagaactgt	25
50	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso POLH	
60	<400> 20	
	gcacagaggaagcattgt g	21
65	<210> 21	
	<211> 18	

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador directo ICOSLG	
	<400> 21	
10	gaccgatgcc tccaacac	18
	<210> 22	
15	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador reverso ICOSLG	
	<400> 22	
25	gagctccggt caaacgtg	18
	<210> 23	
30	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador directo ETS2	
	<400> 23	
40	cccctgtggc taacagttac a	21
	<210> 24	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador reverso ETS2	
	<400> 24	
55	ggacccatca aaggtgtcaa	20
	<210> 25	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> cebador directo CCL7	

## ES 2 366 323 A1

	<400> 25	
	gaaagcctct gcagcacttc	20
5	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso CCL7	
15	<400> 26	
	aatctgtagc agcaggtagt tga	24
20	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo IL1A	
30	<400> 27	
	ggttgagttt aagccaatcc a	21
35	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso IL1A	
45	<400> 28	
	tgctgaccta ggcttgatga	20
50	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo CD163	
60	<400> 29	
	ctggcgtgac atgttctgat	20
65	<210> 30	
	<211> 20	

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador reverso CD163	
	<400> 30	
10	ggctgcctcc accttaagt	20
	<210> 31	
15	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador directo IFI27	
	<400> 31	
25	ctcaggaact ctcctcttt gg	22
	<210> 32	
30	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador reverso IFI27	
	<400> 32	
40	tccgtggcct agagagtaag a	21
	<210> 33	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador directo PLK2	
	<400> 33	
55	agatctcgcg gattatcgtc	20
	<210> 34	
60	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> cebador reverso PLK2	

## ES 2 366 323 A1

	<400> 34	
	tgcaaatct gtcattctgt aaca	24
5	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo FDXR	
15	<400> 35	
	gtgacacagc cgtgattctg	20
20	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso FDXR	
30	<400> 36	
	cttcgtgatg tccgttctct c	21
35	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo IL1B	
45	<400> 37	
	ctgtcctgcg tgtgaaaga	20
50	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso IL1B	
60	<400> 38	
	ttggtaatt ttgggatct aca	23
65	<210> 39	
	<211> 18	

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador directo GDF15	
	<400> 39	
10	ccggatactc acgccaga	18
	<210> 40	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador reverso GDF15	
	<400> 40	
25	agagatacgc aggtgcaggt	20
	<210> 41	
30	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador directo THBS1	
	<400> 41	
40	gccacagttc ctgatggag	19
	<210> 42	
45	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador reverso THBS1	
	<400> 42	
55	ccatggagac cagccatc	18
	<210> 43	
60	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> cebador directo CXCL2	

## ES 2 366 323 A1

<400> 43  
catcgaaaag atgctgaaaa atg 23

5  
<210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador reverso CXCL2

15  
<400> 44  
ttcaggaaca gccaccaata 20

20  
<210> 45  
<211> 19  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador directo CXCR4

30  
<400> 45  
ctgtgagcag aggggccag 19

35  
<210> 46  
<211> 20  
<212> DNA  
40 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador reverso CXCR4

45  
<400> 46  
atgaatgtcc acctcgcttt 20

50  
<210> 47  
<211> 21  
<212> DNA  
55 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador directo PCNA

60  
<400> 47  
tggagaactt ggaatggaa a 21

65  
<210> 48  
<211> 24

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador reverso PCNA	
	<400> 48	
10	gaactggttc attcatctct atgg	24
	<210> 49	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador directo SOCS1	
	<400> 49	
25	gcccctctg taggatggta	20
	<210> 50	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador reverso SOCS1	
	<400> 50	
40	ctgctgtgga gactgcattg	20
	<210> 51	
45	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador directo PTPRE	
	<400> 51	
55	ggctcacctg gttcagga	18
	<210> 52	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> cebador reverso PTPRE	

## ES 2 366 323 A1

	<400> 52	
	catcacccctt tgctgctctt	20
5	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo MITF	
15	<400> 53	
	agggagctca cagagtctga a	21
20	<210> 54	
	<211> 26	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso MITF	
30	<400> 54	
	tgttaaatct tcttctctgt tcaatc	26
35	<210> 55	
	<211> 19	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo CCR7	
45	<400> 55	
	ggggaaacca atgaaaagc	19
50	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso CCR7	
60	<400> 56	
	acctcatctt gacacaggca ta	22
65	<210> 57	
	<211> 20	

## ES 2 366 323 A1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador directo SLA	
	<400> 57	
10	tgccaccttg cgtcagaaga	20
	<210> 58	
15	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador reverso SLA	
	<400> 58	
25	ggggtcctcc tgcagtct	18
	<210> 59	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador directo IL12A	
	<400> 59	
40	cactcccaaa acctgctgag	20
	<210> 60	
45	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> cebador reverso IL12A	
	<400> 60	
55	tctcttcaga agtgcaaggg ta	22
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930428

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.07.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K49/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LAETITIA FURIO et al. "UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells" THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 125, 2005, páginas 1032-1038. Resumen.	1-18
A	QINGHAI HU et al. "SOCS 1 silencing can break high-dose dendritic cell immunotherapy-induced immune tolerance" MOLECULAR MEDICINE REPORTS, vol.1, 2008, páginas 61-70. Página 61.	1-18
A	HONG FU et al. "Dendritic cells transduced with SOCS1 gene exhibit regulatory DC properties and prolong allograft survival" CELULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 6 no. 2, abril 2009, páginas 87-95. Resumen.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
03.10.2011

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LAETITIA FURIO et al. "UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells" THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 125, 2005, páginas 1032-1038. Resumen.	
D02	QINGHAI HU et al. "SOCS 1 silencing can break high-dose dendritic cell immunotherapy-induced immune tolerance" MOLECULAR MEDICINE REPORTS, vol.1, 2008, páginas 61-70. Página 61.	
D03	HONG FU et al. "Dendritic cells transduced with SOCS1 gene exhibit regulatory DC properties and prolong allograft survival" CELULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 6 no. 2, abril 2009, páginas 87-95. Resumen.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un método para identificar un compuesto o una mezcla de compuestos con efecto inmunomodulador en la piel (reivs. 1-2). En dicho método se detecta la cantidad de producto de expresión de los genes PTPRE, ICOSL, Gal-1, Gal-3, SLA, SOCS1, THBS1 o GADD45A (reiv. 3). El efecto inmunomodulador es un efecto inductor de tolerancia inmunológica (reivs. 4-6). Concretamente el efecto inmunomodulador es un efecto fotoprotector de rayos UV (reivs.7-9), y la radiación UV es radiación UVA y/o UVB (reivs. 10). El producto de expresión de dichos genes es el RNAm que se detecta mediante microarray o RT-PCR (reivs. 11-13), y también el producto de expresión de dichos genes es la proteína que se detecta en un extracto de células totales o mediante western-blot (reivs. 14-16). Se reivindica también el kit para llevar a cabo dicho método de identificación (reivs. 17-18).

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 y 8 DE LA LP**

El documento D01 hace referencia al efecto que la radiación UVA tiene sobre el desarrollo del cáncer de piel. Y en dicho documento se hace un estudio sobre los efectos que tiene la radiación UVA sobre las células dendríticas dérmicas (DDC: Dermal Dendritic Cells). La radiación UVA disminuye significativamente el número de células dendríticas dérmicas viables, proceso que se encuentra relacionado con el incremento de apoptosis celular (resumen)

El documento D02 describe el estudio de como vacunas de células dendríticas silenciadas en SOCS1 pueden mejorar enormemente la actividad anti tumoral (página 61).

El documento D03 se refiere a que el gen SOCS1 es un regulador clave de la señalización de citoquina y es importante para mantener el equilibrio en el sistema inmunológico. EL gen SOCS1 inhibe la maduración de células dendríticas e induce la generación regulatoria de células dendríticas por lo que posee un potencial terapéutico para evitar el rechazo de trasplante de órganos (resumen).

Ninguno de los documentos citados, considerados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-18, además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-18 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la LP.