

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 662**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07739368 .4**
- 96 Fecha de presentación: **15.03.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1995595**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA EVALUAR EL NIVEL DE SENSIBILIDAD DE LA PIEL MEDIANTE EL USO DEL ANTÍGENO RELACIONADO CON EL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS COMO INDICACIÓN.**

30 Prioridad:  
**17.03.2006 JP 2006075024**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.03.2012**

73 Titular/es:  
**SHISEIDO COMPANY, LIMITED  
5-5, GINZA 7-CHOME  
CHUO-KU TOKYO 104-8010, JP**

72 Inventor/es:  
**KATAGIRI, Chika;  
NAKANISHI, Jotaro y  
HIBINO, Toshihiko**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 662 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para evaluar el nivel de sensibilidad de la piel mediante el uso del antígeno relacionado con el carcinoma de células escamosas como indicación.

### Campo de la técnica

- 5 La presente invención da a conocer un método para evaluar el grado de sensibilidad de la piel mediante el uso del antígeno celular del carcinoma de células escamosas (SCCA) como un indicador del mismo.

### Antecedentes de la técnica

- El número de personas que cree que tiene la piel sensible, es decir, piel muy sensible que muestra una fuerte reactividad a la irritación y a la agresión externas, ha tendido a aumentar en los últimos años. En particular, más del  
 10 70% de las mujeres jóvenes con una veintena o treintena de años respondieron a un estudio diciendo que tenían la piel sensible. Los factores responsables de la piel sensible incluyen una disminución de la función de barrera de la piel, una disminución del umbral de irritación de la piel, xerodermia, sustancias inflamatorias de dermatitis de contacto, irritación fisicoquímica, estrés, condición física, cambios estacionales, rayos ultravioletas y menstruación. Además, también había casos en los que las participantes que respondieron indicaron que tenían la piel sensible a  
 15 pesar de ser resistentes a la agresión de la piel, lo que da lugar por lo tanto a la necesidad de un indicador bioquímico objetivo y adecuado de la sensibilidad de la piel.

Este tipo de piel sensible se define del modo indicado a continuación.

1. Piel propensa a la aparición de problemas cutáneos debido a que reacciona específicamente a sustancias tales como sustancias farmacéuticas aplicadas desde el exterior, cosméticos, plantas, rayos ultravioleta o metales y  
 20 similares de forma regular, y que es sensible por constitución a los alérgenos (tales como polen o perfume) o a los irritantes (tales como el alcohol) debido a que disminuye la función de barrera de la piel, y más específicamente, se considera que es el resultado de una constitución alérgica o de una constitución hipersensible, que presenta síntomas tales como la propensión a la xerodermia (piel áspera), propensión a tener la piel agrietada y propensión a las erupciones cutáneas debido a que disminuye la función de barrera de la piel.
- 25 2. Piel propensa a problemas temporales cutáneos durante momentos en los que la resistencia inherente de la piel o las funciones fisiológicas de la piel están debilitadas por factores tales como la falta de sueño, la fatiga, la menstruación, los cambios estacionales y el estrés psicológico.

- La sensibilidad de la piel a las diferentes irritaciones y agresiones externas varía de una persona a otra y, por ejemplo, incluso aunque una persona pudiera tener la piel áspera al dar una reacción de sensibilidad a un  
 30 determinado fármaco, otra persona podría no mostrar ninguna reacción en absoluto. Además, aunque una persona puede mostrar inmediatamente la piel áspera en respuesta a un fármaco o a una irritación externa, otra persona puede desarrollar la aspereza de la piel solo después de la irritación continua. En el pasado, el grado de sensibilidad de la piel se determinaba sólo después de que apareciera la piel áspera. Sin embargo, una vez que ha aparecido la piel áspera, hay una carga física y psicológica considerable, se necesita más tiempo para recuperarse o pueden  
 35 aparecer cicatrices que son difíciles de tratar. Por consiguiente, si fuera posible medir y reconocer con anterioridad el grado de sensibilidad y reactividad a la irritación y agresión externas de la piel de un individuo, sería posible prevenir la piel áspera con anterioridad y también sería posible seleccionar el cuidado de la piel que sea adecuado para la piel muy sensible, lo que hace que esto sea enormemente importante.

- El antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA, por sus siglas en inglés) es un antígeno extraído de las  
 40 células del carcinoma de células escamosas que aparece en concentraciones elevadas en la sangre cuando existe carcinoma de células escamosas del cuello de útero, de pulmones, de esófago y de piel, y se utiliza con frecuencia para diagnosticar el carcinoma de células escamosas (H. Kato et al., *Cancer* 40: 1621-1628 (1997); N. Mino et al., *Cancer* 62: 730-734 (1988)). En particular, dado que la concentración del SCCA en la sangre está estrechamente correlacionada con la etapa de avance, malignidad y tamaño del tumor del carcinoma de células escamosas, es un  
 45 marcador de cáncer particularmente útil no sólo para la detección temprana del cáncer, sino también para la evaluación de la eficacia del tratamiento del cáncer y del diagnóstico del riesgo de recidiva.

- También se sabe que el SCCA muestra un aumento de la expresión en la capa superior de la epidermis psoriásica (Takeda, A. et al., *J. Invest. Dermatol.* (2002) 118(1), 147-154). La psoriasis es un tipo de enfermedad de la piel que se acompaña de paraqueratosis inflamatoria recurrente y crónica caracterizada por anomalías de proliferación y  
 50 diferenciación de las células epidérmicas e infiltración de células inflamatorias. Se cree que la psoriasis se produce debido a la intervención de varios factores medioambientales además de los factores genéticos (Hopso-Havu et al., *British Journal of Dermatology* (1983) 109, 77-85).

El SCCA está codificado por dos genes, a saber, los genes *SCCA-1* y *SCCA-2* dispuestos en tándem en el cromosoma 18q21.3. Cada una de las proteínas *SCCA-1* y *SCCA-2* codificadas por ellos tienen una masa molecular

de unos 45 000 Da, son muy homólogas, y su homología a nivel del ácido nucleico es del 95%. Estas proteínas SCCA pertenecen a una familia de inhibidores de la ovoalbúmina-serina proteasa (ov-serpinas). Las ov-serpinas tienen unas características únicas dentro de la superfamilia de las serpinas. Aunque se dice de forma general que las serpinas se excretan y que funcionan en el exterior de la célula, las ov-serpinas funcionan principalmente dentro de las células en forma de inhibidores de proteasas.

Aunque el SCCA-1 es un inhibidor de cisteína proteasas de tipo papaína, el SCCA-2 es un inhibidor de serina proteasas de tipo quimotripsina, y a pesar de que tiene una alta homología, como la secuencia de aminoácidos del centro activo difiere de la de SCCA-1, por ello tiene propiedades diferentes (Schick et al., *J. Biol. Chem.* (1997) 27213, 1849-55). Aunque se sabe que el SCCA-1 y el SCCA-2 se expresan en gran cantidad en respuesta a enfermedades tales como la psoriasis, así como la piel irradiada con UV, se desconoce la manera en la que están implicados en las propiedades de la piel.

La identificación de genes regulados de forma aberrante en la piel enferma, en particular en la psoriasis, utilizando la técnica de visualización diferencial de ADNc, se describe en M. Rivas et al., *J. Investigative Dermatology*, 1997, 108, 188-194.

### 15 Descripción de la invención

Como resultado de llevar a cabo la investigación con el propósito de dilucidar el mecanismo fisiológico de la implicación del SCCA en la epidermis, los inventores de la presente invención encontraron que el grado de sensibilidad y de reactividad de la piel está relacionado con la cantidad de SCCA en la epidermis, y que los sujetos que tienen más cantidad de SCCA en la epidermis mostraron una reactividad elevada a la irritación cutánea. Así pues, se consideró que la expresión del SCCA es un indicador de la sensibilidad y de la reactividad de la piel, lo que conduce a la consecución de la presente invención.

La presente invención da a conocer un método para evaluar el grado de sensibilidad y de reactividad de la piel basándose en la expresión del antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA), más específicamente de SCCA-1 y/o de SCCA-2, y en particular SCAA-1, en los corneocitos de la piel. Preferentemente, la expresión del SCCA se lleva a cabo mediante un inmunoensayo enzimático de adsorción (ELISA) utilizando los anticuerpos específicos contra el SCCA. En un aspecto más preferente de la misma, se recoge una muestra de la capa córnea de la piel mediante abrasión con esparadrapo.

De acuerdo con el método de la presente invención, se puede evaluar a nivel bioquímico el grado de sensibilidad y reactividad de la piel.

### 30 Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestran los diagramas de correlación entre la cantidad expresada de SCCA y de PTEA en la piel normal.

En la figura 2 se muestran los valores de la PTEA y la cantidad expresada de SCCA-1 después de la aplicación de ácido oleico.

En la figura 3 se muestran las fluctuaciones de la PTEA y de la cantidad expresada de SCCA-1 después de la aplicación de ácido oleico.

En la figura 4 se muestra un diagrama de correlación entre las fluctuaciones de la PTEA y de la cantidad expresada de SCCA-1.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Tal y como se mencionó más arriba, el SCCA es una proteína que tiene una masa molecular de unos 45 000 Da que aparece en las células del carcinoma de células escamosas y en la epidermis psoriásica. La secuencia de aminoácidos de SCCA-1 y de SCCA-2 junto con las secuencias de ácido nucleico mediante las que se codifican se describen en Takeda et al., *J. Invest. Dermatol*, 118, 147-154 (2002) (obra citada anteriormente.).

La medición de la expresión del SCCA de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo cuantitativa o cualitativamente mediante cualquier método capaz de medir el SCCA. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen distintos métodos tales como un inmunoensayo que utiliza un anticuerpo específico contra el SCCA, por ejemplo, ELISA que utiliza un marcador enzimático, RIA que utiliza un marcador radiactivo, inmunonefelometría, inmunotransferencia, aglutinación con látex o aglutinación de eritrocitos. Ejemplos de inmunoensayos incluyen ensayos competitivos y ensayos de sándwich. Además, la cantidad de SCCA expresado también se puede determinar midiendo la cantidad de expresión intracelular del gen que codifica el SCCA. En este caso, la expresión de SCCA se determina preferentemente midiendo la cantidad del ARNm intracelular que codifica la secuencia de SCCA. La extracción del ARNm y la medición cuantitativa o cualitativa de la cantidad del mismo son conocimiento

corriente de la técnica, y se puede llevar a cabo mediante métodos diferentes conocidos, tales como PCR, 3SR, NASBA o TMA. Además, la expresión de SCCA también se puede determinar cualitativamente a través de la hibridación *in situ* o de la medición de la actividad biológica del mismo.

5 Aunque la extracción de especímenes en forma de muestras de la capa córnea de la piel se puede llevar a cabo mediante cualquier método, se prefiere la abrasión con esparadrapo desde el punto de vista de la sencillez del procedimiento. La abrasión con esparadrapo se refiere a un método de recogida de muestras de la capa córnea aplicando una cinta adhesiva sensible a la presión en la epidermis de la piel, y luego despegar la cinta para así dejar adherida la capa córnea de la piel a la cinta adhesiva sensible a la presión que se acaba de despegar. El uso del método de abrasión con esparadrapo permite evaluar la piel sensible de un modo no invasivo mediante el indicador 10 SCCA, al permitir medir la expresión del SCCA de un modo simple recogiendo la capa córnea de un trozo de cinta. Un método preferente para la abrasión con esparadrapo comprende, primero, retirar el material sebáceo, la suciedad y similar, de la epidermis de la piel limpiándola con etanol o similar, presionando suavemente un trozo de cinta adhesiva sensible a la presión cortada a un tamaño adecuado (por ejemplo, 2 x 5 cm) sobre la superficie de la piel, presionando uniformemente la cinta sobre la piel al mismo tiempo que se aplica una fuerza igual a todo el trozo de 15 cinta, y luego despegar la cinta adhesiva sensible a la presión con una fuerza uniforme. La cinta adhesiva sensible a la presión se puede adquirir comercialmente como cinta de celofán y similares, y ejemplos de tal cinta que se pueden utilizar incluyen la cinta Scotch Super Strength Mailing (3 M Corp.) y Cellophane Tape (CelloTape™, Nichiban Co, Ltd). El SCCA presente en una muestra de la capa córnea de la piel adherida a la cinta adhesiva sensible a la presión se puede aislar y extraer de la cinta al sumergir el trozo de cinta en una solución de extracción adecuada tal como tampón Tris (pH 8,0) (Tris-HCl a 0,1 M, NaCl a 0,14 M, Tween-20 a 0,1%) y extraer la capa córnea. 20

En una realización preferente de la presente invención, se mide el SCCA mediante un método de inmunoensayo tal como ELISA. El anticuerpo específico contra el SCCA utilizado en el ELISA puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Los métodos para preparar el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal son parte del conocimiento corriente de las personas expertas en la técnica y se describen en, por ejemplo, Lunstrum et al., *J. Biol. Chem.* 1986, 261: 9042-9048; Hurlle et al., *J. Cell. Science* 1994, 107: 2623-2634. 25

En el método que se reivindica en la presente invención, es particularmente preferente un método de inmunoensayo en sándwich. El inmunoensayo en sándwich se puede llevar a cabo, por ejemplo, del modo descrito a continuación.

Uno de dos anticuerpos específicos contra el SCCA se inmoviliza en un soporte como primer anticuerpo. Es preferente un soporte sólido para el soporte, y se puede utilizar, por ejemplo, cualquier soporte utilizado 30 convencionalmente en inmunoensayos como un soporte sólido, ejemplos del cual incluyen un soporte de polímero hecho de estireno o poliestireno formado a un tamaño y forma arbitrarios, y un recipiente de reacción moldeado de estos materiales adecuados, tales como las paredes internas de los pocillos de una placa de ELISA.

La inmovilización del primer anticuerpo al soporte se puede realizar de acuerdo con los métodos convencionales. Por ejemplo, el primer anticuerpo se puede disolver en, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 35 o tampón de borato, seguido de la adsorción a un soporte para inmovilizar el primer anticuerpo al soporte. Además, el bloqueo se lleva a cabo preferentemente para inhibir la unión inespecífica añadiendo un agente bloqueante adecuado, tal como PBS-SAB o un agente bloqueante disponible en el mercado tal como Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), al soporte inmovilizado con el primer anticuerpo de este modo, seguido de la incubación durante 5 minutos a varios días, preferentemente de 10 minutos a 24 horas y más preferentemente durante 10 40 minutos a 3 horas, a unos 4 a 40 °C y preferentemente de 20 a 37 °C.

El otro de los dos anticuerpos específicos contra el SCCA se utiliza como anticuerpo secundario y marcado. Ejemplos de marcadores incluyen marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes y similares. En el caso del marcador enzimático, la enzima se puede unir directamente al anticuerpo secundario o el anticuerpo secundario se puede marcar con la enzima a través de proteínas interactivas, tales como avidina-biotina. 45 La unión de una enzima al anticuerpo se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, la introducción respectiva de un grupo tiol en la enzima y de un anticuerpo a marcar utilizando el reactivo de inserción de grupo tiol disponible en el mercado, y luego uniendo los dos mediante puentes disulfuro. Ejemplos de enzimas incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -D-galactosidasa. La enzima se puede detectar con un sustrato específico de la enzima. Por ejemplo, en el caso de utilizar la peroxidasa de rábano picante, se puede emplear TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) o ABTS (2,2'-azina-di[3-etilbenzotiazolina-sulfonato]). 50

Este método de inmunoensayo comprende la etapa de incubar una mezcla del soporte inmovilizado con el primer anticuerpo, el anticuerpo secundario marcado y la muestra problema, lo que hace que el SCCA de la muestra problema se fije al primer anticuerpo inmovilizado en el soporte y hace que el anticuerpo secundario marcado se fije a las moléculas del SCCA.

55 De este modo, el anticuerpo marcado se inmoviliza en el soporte a través del primer anticuerpo inmovilizado en el soporte y el SCCA procedente de la muestra en una cantidad que refleja la cantidad de SCCA en la muestra. La incubación se lleva a cabo en un tampón adecuado tal como PBS durante 5 minutos hasta varios días,

preferentemente de 10 minutos a 24 horas y más preferentemente de 10 minutos a 3 horas a unos 4 a 40 °C y preferentemente de 20 a 37 °C.

A continuación se lleva a cabo un procedimiento para separar del soporte el anticuerpo marcado sin fijar. En el caso de utilizar un soporte sólido para el soporte, este procedimiento de separación se puede llevar a cabo con facilidad mediante la separación del sólido y del líquido. En el caso de utilizar una cantidad conocida y fija del anticuerpo secundario marcado, se pueden medir la marca fijada al soporte, la marca sin fijar o ambas. Por otra parte, en el caso de utilizar un anticuerpo marcado, se detecta y se mide la marca fijada al soporte. La detección de la marca fijada al soporte se lleva a cabo preferentemente lavando primero el soporte con una solución de lavado, por ejemplo, un tampón que contiene un surfactante adecuado, tal como PBS-Tween-20, para retirar el anticuerpo marcado sin fijar. La detección se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos convencionales según el tipo de marca.

Lo siguiente proporciona una explicación más detallada de la presente invención a través de las realizaciones específicas de la misma. No obstante, la presente invención no se limita a esos ejemplos.

Materiales y métodos.

#### 15 (1) Anticuerpo

El anticuerpo policlonal que reconoce a SCCA-1 y a SCCA-2 se preparó utilizando SCCA (SCCA-1 y SCCA-2) purificado de escamas de epidermis psoriásica. Después de centrifugar un extracto de escamas de epidermis psoriásica (disolución de extracción: Tris-HCl a 0,1 M [pH 8,0], NaCl a 0,14 M), se purificó el sobrenadante con Sephacryl S-200, DEAE Sepharose, Mono Q, Mono S, Mono P y Superrose 6, seguido del uso del sobrenadante purificado como antígeno y del uso de conejos como animales sensibilizados.

El anticuerpo monoclonal anti-SCCA-1 y el anticuerpo monoclonal anti-SCCA-2 se adquirieron a Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.

#### (2) ELISA

Se recogieron muestras de la capa córnea de la piel mediante abrasión con esparadrapo que comprende las etapas de aplicar una cinta adhesiva transparente sensible a la presión (Cellotape™, Nichiban Co., Ltd.) a la superficie de la piel y después se despegó la cinta. La cinta que lleva adherida la capa córnea de la piel se cortó en trozos, se sumergieron en un tampón de extracción (Tris-HCl a 0,1 M, [pH 8,0], NaCl a 0,14 M, Tween-20 al 0,1%, 1 ml) y se sometió a tratamiento con ultrasonidos (20 s x 4) para preparar los extractos de la muestra.

En cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos se dispuso una alícuota de 100 µl de anticuerpo policlonal anti-SCCA diluido con PBS (dilución 1:1000) y se dejaron reposar durante una noche a temperatura ambiente para que se fijaran a la fase sólida de la placa. Posteriormente, para inhibir la unión inespecífica a la placa, el anticuerpo policlonal fijado se incubó durante 1 hora en una disolución de bloqueo (disolución que contiene Block Ace diluido con PBS-Tween-20, 30 µl/pocillo).

A cada pocillo de la placa de ELISA se le añadieron 50 µl del extracto de la muestra anterior y se dejó reaccionar durante 2 horas a 37 °C. Luego se añadió el anticuerpo monoclonal anti-SCCA-1 (diluido a 1:1000) y se dejó reaccionar durante 1 hora a 37 °C. A continuación se añadió el anticuerpo secundario en forma de anticuerpo antirratón marcado con peroxidasa de rábano picante y se dejó reaccionar durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar con PBS con Tween-20 al 0,1%, se le añadió un sustrato, a saber, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y después se reveló el color mediante el kit TMB Peroxidase ELISA Substrate (Bio-Rad) y se midió a 630 nm.

#### 40 (3) Medición de la pérdida transepidérmica de agua (PTEA) de la piel

Se midió la PTEA de especímenes (del rostro y de la parte interior del brazo de sujetos normales) mediante un PTEA-metro (TM120).

#### (4) Correlación entre la expresión del SCCA y la pérdida transepidérmica de agua (PTEA)

La cantidad de SCCA expresado en la capa córnea de la piel se midió mediante ELISA investigando conjuntamente un parámetro fisiológico de la piel en forma de PTEA para investigar la correlación entre la expresión del SCCA y la PTEA. Los resultados se muestran en la figura 1. El coeficiente de correlación de Pearson entre el SCCA-1 y la PTEA fue de 0,876, mientras que entre el SCCA-2 y la PTEA fue de 0,600, observándose una correlación significativa entre ambos. Por lo tanto, la cantidad de SCCA-1 y de SCCA-2, y en particular de SCCA-1, que se expresaba se encontró que aumentaba cuando la PTEA era elevada y la afección cutánea era comparativamente mala.

## (5) Expresión de SCCA durante la irritación química

Un irritante químico en forma de ácido oleico al 10% se aplicó a la piel de la frente (área expuesta) y la parte interna del brazo (área no expuesta) los días 1 y 2. Además de medir los valores de PTEA de la piel antes de la aplicación del ácido oleico el día 4 después de la aplicación del ácido oleico, se recogió la capa córnea de cada área de piel mediante abrasión con esparadrapo seguida de la medición de la cantidad de expresión de SCCA-1 mediante ELISA. A continuación se investigó la relación entre la PTEA y la piel antes y después de la aplicación del ácido oleico.

En la figura 2 se muestra la relación entre la PTEA y la piel antes de la aplicación del ácido oleico (a) y la relación entre la expresión de SCCA-1 y la piel antes de la aplicación del ácido oleico (b). Como queda claro a partir de la figura 2(a), a diferencia de haber observado un incremento significativo del valor de la PTEA en la frente debido a la aplicación del ácido oleico, en la parte interna del brazo no se observó ningún aumento significativo de la PTEA atribuible a la irritación química. Por lo tanto, aunque la aplicación del ácido oleico en la frente ocasionó una disminución significativa de la función de barrera de la piel, se encontró que apenas había ninguna disminución de la función de barrera en la parte interior del brazo, lo que así demuestra que la frente es más sensible a la irritación química que la parte interior del brazo.

En la figura 2(b) se muestra la cantidad de SCCA-1 que se expresa antes y después de la aplicación del ácido oleico. Basándose en estos resultados, la cantidad de SCCA-1 en la frente es elevada, y la cantidad de SCCA-1 aumenta significativamente en respuesta a la irritación química. Por otra parte, la cantidad de SCCA-1 en la parte interior del brazo era considerablemente más baja que la del rostro. Así pues, se demostró claramente que la frente, que es más sensible a la irritación química, mostraba una expresión más elevada de SCCA-1 en comparación con la parte interior del brazo.

En la figura 3 se muestran las fluctuaciones de los valores de PTEA (a) y las fluctuaciones de la expresión de SCCA-1 (b) en la frente y en la parte interna del brazo antes y después de la aplicación del ácido oleico (a). Aunque la figura 3(a) indica que la frente es más sensible a la irritación química que la parte interior del brazo del mismo modo que en la figura 2(a), a diferencia de la figura 3(b) que indica un aumento significativo en la expresión de SCCA-1 debido a la irritación química en la frente, que se demostró previamente que era muy sensible, la expresión de SCCA-1 en la parte interior del brazo, que previamente se había demostrado que tenía una sensibilidad baja, no se observó que mostrara ningún cambio significativo. Así pues, la frente, que es muy sensible a la irritación química, mostró un aumento de la expresión de SCCA-1 después de la aplicación del ácido oleico, y se cree que ha conducido a una disminución de la función de barrera de la piel.

En la figura 4 se muestra la correlación entre las fluctuaciones de los valores de la PTEA y las fluctuaciones de la cantidad de SCCA-1 expresado para la piel a la que se aplicó ácido oleico. La figura 4 resume los valores obtenidos para la piel de la frente y de la parte interior del brazo. Se puede observar a partir de esta figura que cuanto más elevada está la cantidad de SCCA-1 en la epidermis de un individuo antes de la aplicación del ácido oleico, mayores son las fluctuaciones de los valores de la PTEA después de la aplicación del ácido oleico. En particular, esto sugirió que cuanto más cantidad de SCCA-1 hay en la epidermis de un individuo antes de la aplicación del ácido oleico, más elevada es la proporción de la disminución de la función de barrera de la piel atribuible a la irritación externa (el coeficiente de correlación de Pearson entre SCCA-1 y PTEA fue de 0,7668, lo que indica una correlación significativa). Por lo tanto, el nivel de expresión de SCCA-1 en la epidermis de cada individuo se sugirió que era un indicador de la sensibilidad y de la reactividad de la piel a la irritación externa en forma de irritación química.

## (6) Nivel de expresión de SCCA-1 en la piel expuesta que presenta paraqueratosis, piel alérgica, xerodermia atópica y piel psoriásica

Se recogieron especímenes de la capa córnea mediante abrasión con esparadrapo de un área no expuesta de la piel (parte interior del brazo) que muestra unas propiedades normales de la piel, un área expuesta de la piel (rostro) que presenta paraqueratosis, piel de pacientes que padecen piel áspera ocasionada por piel alérgica atribuible a polinosis, piel de pacientes que padecen dermatitis atópica, y piel de pacientes que padecen psoriasis, seguido de la medición de la cantidad de SCCA-1 que se expresa mediante ELISA como se describió anteriormente.

Los resultados se muestran en la tabla 1. Se observó un aumento considerable de la cantidad de SCCA-1 en todas las pieles examinadas, con la excepción de la piel de un sitio no expuesto, que hacía de muestra de las propiedades normales de la piel (control). Los niveles de expresión de SCCA-1 eran 16 veces más elevados en la xerodermia atópica, 90 veces más elevados en la piel expuesta, 232 veces más elevados en piel alérgica inducida por polinosis, y 466 veces más elevados en la piel psoriásica en comparación con el control. Basándose en estos resultados, se observó que el SCCA-1 mostraba claramente un considerable incremento de la expresión en la piel muy sensible a la irritación, es decir, en la piel sensible y muy reactiva propensa a una posterior piel áspera a un nivel bajo de irritación.

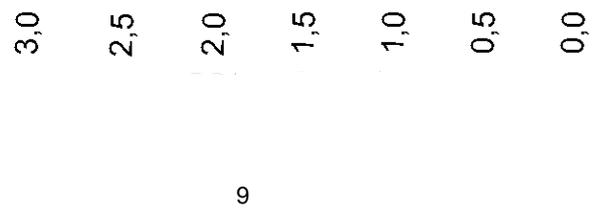
Tabla 1: Aumento de SCCA-1 en la piel paraquerósica

Piel	SCCA-1	Análisis estadístico
Piel normal (área sin exponer)	1,0 ± 0,1	--
Xerodermia atópica	15,5 ± 4,1	**
Piel expuesta	90,0 ± 16,6	***
Piel alérgica	232,2 ± 32,6	***
Psoriasis	465,8 ± 146,0	***
Media ± DE: ** : $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$ (prueba t)		

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* para evaluar el grado de sensibilidad de la piel que comprende: utilizar la expresión del antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA por sus siglas en inglés) en los corneocitos de la piel como un indicador de la misma, en el que una mayor cantidad de SCCA en la epidermis demuestra que hay una intensa reactividad a la irritación de la piel.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sensibilidad de la piel es la debida a la irritación química.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la expresión de SCCA se lleva a cabo mediante un inmunoensayo enzimático de adsorción (ELISA) utilizando anticuerpos específicos contra el SCCA.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el espécimen de la capa córnea de la piel se recoge mediante abrasión con esparadrapo.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el SCCA es SCCA-1.

Fig. 1

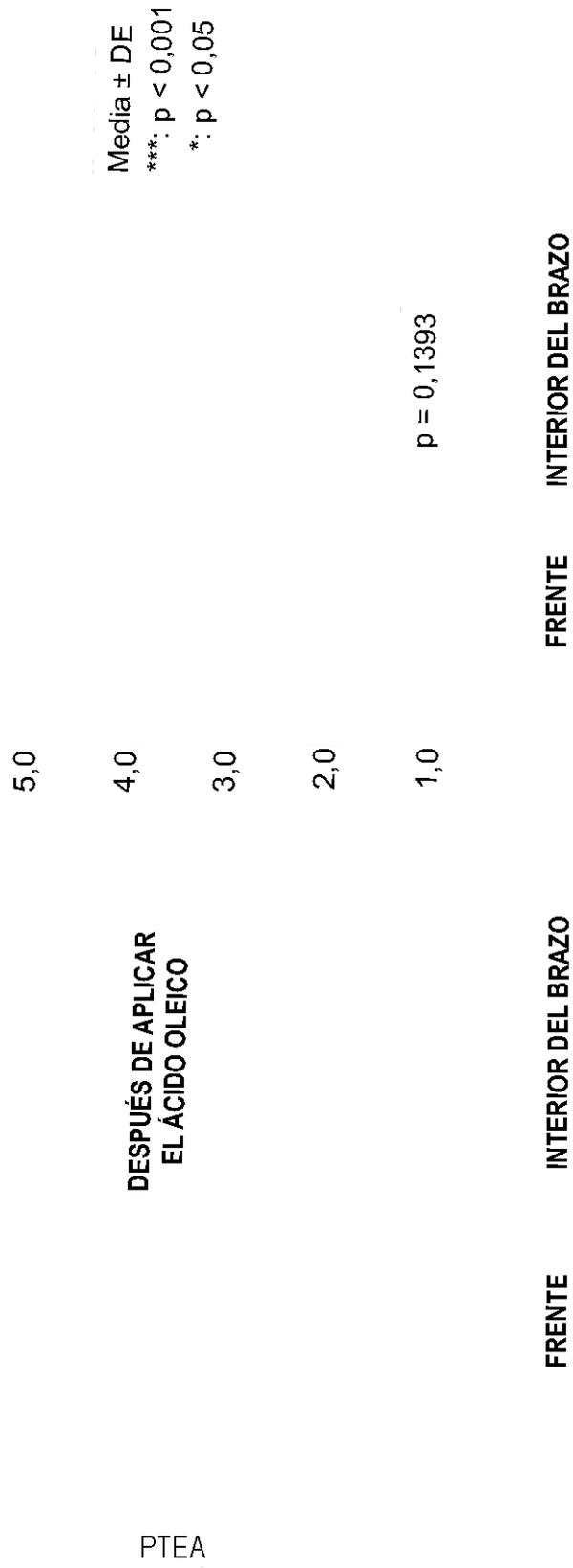


9

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN de Pearson: 0,876

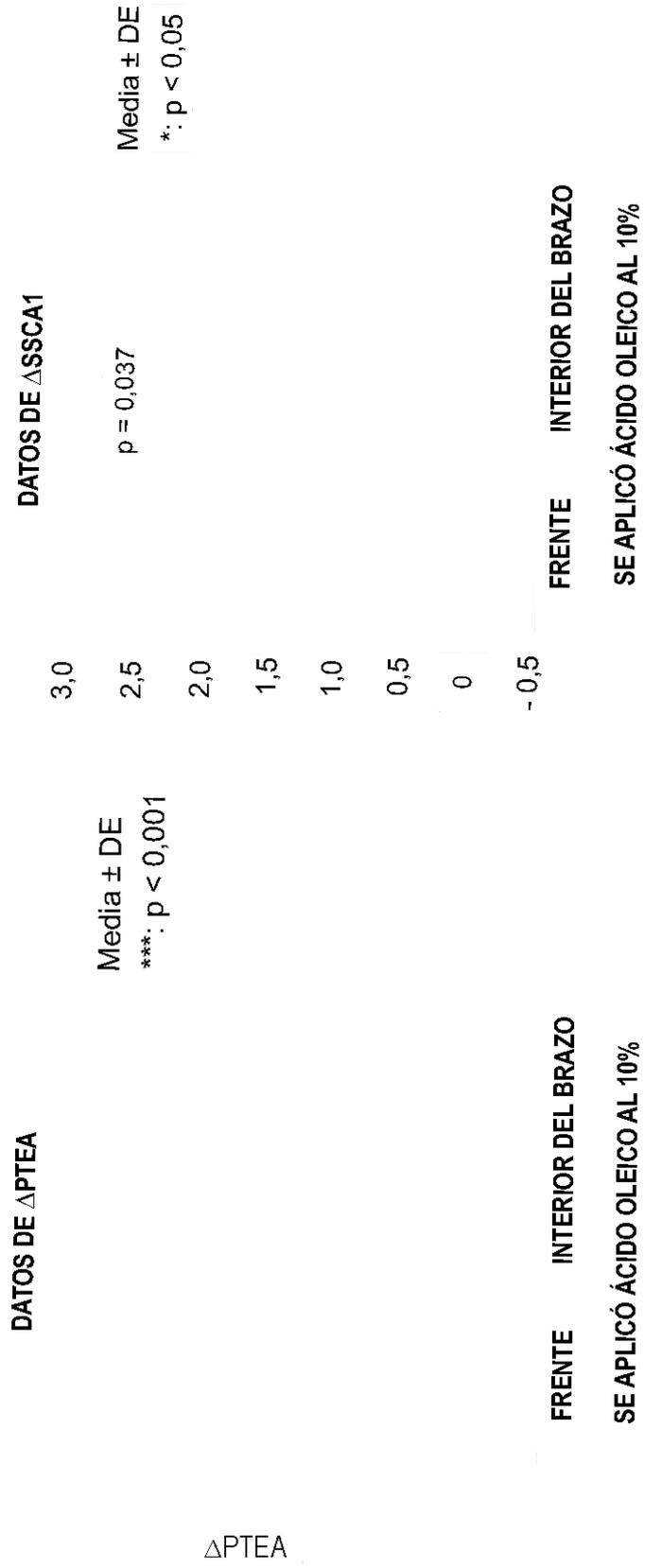
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN de Pearson: 0,600

Fig. 2



PTEA

Fig. 3



# Fig. 4

$\Delta$ PTEA

1,00      2,00      3,00      4,00

**COEFICIENTE DE CORRELACIÓN de Pearson: 0,766**