

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 040**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2007** **E 07726298 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 1978972**

54 Título: **Utilización de ésteres de alquilglucósido como inductores de beta-defensinas**

30 Prioridad:

02.02.2006 FR 0600949

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

11.03.2014

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, PLACE ABEL-GANCE
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:

**CHARVERON, MARIE;
TARROUX, ROGER;
BORDAT, PASCAL y
DUPLAN, HÉLÈNE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 447 040 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

Utilización de ésteres de alquilglucósido como inductores de beta-defensinas.

5 La presente invención se refiere a unos ésteres de alquilglucósido como principios activos que provocan un reequilibrio de la flora comensal de la piel y de las mucosas y/o una disminución de la adhesión de los microorganismos patógenos sobre el tejido epitelial por inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos endógenos, para su utilización en una composición tópica dermatológica o dermocosmética destinada al tratamiento preventivo o curativo de las afecciones microbianas.

10 En el marco de la presente invención, los productos a base de "mono- o di-éster de alquilo de α,β -butilglucósido" se utilizan para desencadenar una reacción inmune en un organismo hospedante por generación *in vivo* de péptidos antimicrobianos endógenos, de la familia de las β -defensinas (hBD-2, hBD-3) y de las catelicidinas (LL-37), protectores frente a infecciones por microorganismos vivos tales como los virus encapsulados, las bacterias o los parásitos, que conducen así a la eliminación selectiva del o de los agentes patógenos. Estos productos no estimulan, de manera concomitante o separada, unas reacciones inflamatorias, una irritación o una intolerancia.

15 Estos productos pueden ser utilizados a título preventivo (tratamiento profiláctico) o curativo (tratamiento terapéutico) durante infecciones de los tejidos epiteliales cutáneos y córneos, de las mucosas gingivales y vaginales, con el fin de reequilibrar la microflora y favorecer la homeostasis epitelial durante fenómenos infecciosos durante los cuales se alteran los procesos de cicatrización.

20 La utilización de ésteres de alquilglucósido según la presente invención está más particularmente destinada a la preparación de una composición tópica dermatológica o dermo-cosmética destinada al tratamiento de la dermatitis atópica, destinada a favorecer la homeostasis epitelial para el tratamiento de afecciones oftálmicas, para el tratamiento de afecciones gingivales o también para favorecer la homeostasis epitelial en el tratamiento de afecciones vaginales.

25 Se conocen unas composiciones dermatológicas que comprenden un polisacárido y un sacárido de bajo peso molecular que actúan en sinergia, para tratar las dermatosis de contacto (US n° 5.837.266 y US n° 5.888.520).

30 Las interfaces epiteliales de los vertebrados superiores tienen una importancia estratégica evidente, ya que se trata del sitio de primer contacto de un organismo con el entorno microbiano antigénico. Los epitelios escamosos estratificados funcionan como "barrera" frente a los traumatismos mecánicos, a la pérdida de piel y a las infecciones microbianas. Para comprender esta función, sólo se pueden aislar estos epitelios de su entorno físico, tal como la estanqueidad conferida por los sistemas de adhesión inter-celulares (Presland & Dale, 2000), pero también químico o microbiano.

35 Así, el epitelio desempeña paralelamente un papel activo en las defensas inmunitarias del hospedante, activadas durante las agresiones exógenas y en particular en la inmunidad innata o natural, que constituye una primera línea de defensa, caracterizada por una respuesta inmediata y no específica. Uno de los mecanismos es la inducción por las células epiteliales de órganos tales como la piel, los bronquios, los intestinos, las vías urinarias, el ojo, el aparato genital, de compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica (véase Koczulla y Bals, 2003; Yang D., *et al.* 2004). Estos péptidos producidos por las células epiteliales funcionarían en una cierta medida manteniendo la flora natural de los microorganismos en un estado de equilibrio apropiado a cada nicho ecológico. La microflora comensal desempeña en efecto un papel importante en este entorno, limitando la colonización por gérmenes patógenos y estimulando las defensas naturales inmunitarias.

40 Están repartidos en cuatro grupos en base a su tamaño, su secuencia en aminoácidos y su estructura (Koczulla & Bals, 2003). Entre estos grupos:

45

- la familia de las defensinas es objeto de investigaciones importantes desde finales de los años 90 (véanse Gantz, 1999; Huttner & Bevins, 1999). Todas las defensinas son unos péptidos policatiónicos ricos en aminoácidos básicos, que forman tres puentes disulfuros a partir de sus seis residuos de cisteína que conducen a una estructura en triple hoja beta. En base a la alineación de estos puentes disulfuros, se han definido dos clases de defensinas, las α y β -defensinas (Koczulla & Bals, 2003). Principalmente, se han puesto en evidencia cuatro β -defensinas, o bien después del aislamiento a partir de los epitelios, HBD-1 y 2 (Weinberg *et al.*, 1998) o mediante cribado biomolecular, HBD-3 y 4 (Koczulla & Bals, 2003).

50

- la familia de las catelicidinas constituye otro gran grupo de péptidos antimicrobianos encontrado en numerosos mamíferos. Se ha puesto en evidencia un sólo péptido de esta familia en el ser humano, hCAP18/LL-37 (Zanetti *et al.*, 2004). Su expresión se ha encontrado en varios tejidos epiteliales y en particular en los queratinocitos durante patologías cutáneas de tipo inflamatorio (Frohman *et al.*, 1997), pero también en diversas células inmunitarias (monocitos, células NK y linfocitos B) (Yang *et al.*, 2004). Este péptido está compuesto al principio por un péptido señal en el extremo NH₂-terminal (pre-región), por una región conservada, el dominio tipo catelina (pro-región) y por el dominio antimicrobiano en COOH terminal LL-

37. La catelicidina se almacena en los gránulos de los neutrófilos en forma inactiva Catelina/LL-37 y después es escindida por la elastasa o la proteinasa 3 para liberar LL-37 (Koczulla & Bals, 2003).

En la mayoría de los epitelios, el péptido HBD-1 está expresado constitutivamente mientras que HBD-2, HBD-3 y LL-37 son inducibles por los estímulos pro-inflamatorios como el TNF- α o la IL1- β , los estímulos infecciosos y el nivel de diferenciación de los queratinocitos cutáneos (Liu *et al.*, 2002; Frohm *et al.*, 1997). Los receptores o PRR (Gordon, 2000) utilizados para esta inducción, encontrados más frecuentemente son los receptores de la inmunidad innata y en particular los receptores Toll Like o TLR (TLR2 y TLR4) y CD14 (Chung y Dale, 2004), pero también PAR-2 (Protease activated receptor) (Chung *et al.*, 2004) que implican la activación de las vías de señalización (NF)- κ B o AP-1.

Las β -defensinas y LL-37 presentan un amplio espectro antimicrobiano: bacterias, hongos y parásitos. Su función microbicida se basa en su estructura anfipática, que permite su asociación con la superficie membranaria microbiana, su agregación y finalmente la formación de poros (Gallo RL & Huttner KM., 1998; Zaiou *et al.*, 2003). HBD-2 ejerce una acción bactericida sobre las cepas de gram negativo, pero generalmente restringida a una acción bacteriostática sobre las cepas de gram positivo. De forma complementaria, el péptido HBD-3 tiene una fuerte actividad microbicida que incluye las bacterias de tipo gram negativo, pero también gram positivo tal como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Schibli *et al.*, 2002). LL-37 presenta no sólo una amplia actividad microbicida dirigida contra las bacterias de gram negativo y positivo (Zaiou *et al.*, 2003), sino también unos efectos antimicrobianos sinérgicos con el de las β -defensinas, en particular HBD-2 que lo vuelven bactericida frente a *S. aureus* (Ong *et al.*, 2002).

Además de esta actividad antimicrobiana directa, las β -defensinas y la catelicidina LL-37 epiteliales son capaces, a concentraciones sub-micromolares, de ejercer un cierto número de otras actividades de señalización que conducen a la iniciación de las defensas inmunes adaptativas y así servir de unión entre la inmunidad innata y adaptativa (véase Yang D., 2002 y 2004). Así, las β -defensinas HBD-2 y -3 son capaces de emitir una señal quimiotáctica que permitirá el reclutamiento de las células dendríticas inmaduras y de los linfocitos T de memoria, sobre el sitio de la infección por medio del receptor específico CCR6 (Yang D. *et al.*, 1999; véase Yang D. *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que HBD-2 podía inducir la maduración de estos linfocitos por medio de un receptor Toll-like TLR-4 llevado por las células dendríticas (Biragyn A. *et al.*, 2002). Por su parte, LL-37 posee unas propiedades importantes de señalización, como el quimiotactismo de las células inmunitarias, a concentraciones del orden del nanomolar. Este péptido contribuye así al reclutamiento de neutrófilos, de mastocitos, de monocitos y de macrófagos por medio del Human Formyl Peptide Receptor Like-1 (FPR1) (Scott *et al.*, 2002). (Véase Yang D. *et al.*, 2004).

Se le atribuyen otras funciones tales como una acción protectora frente a choques endotóxicos bloqueando la unión del LPS con las células que expresan el CD14, pero también su actividad en el campo de la angiogénesis y de la cicatrización (Koczulla R. *et al.*, 2003; Véase Yang D. *et al.*, 2004).

En el caso de ciertas patologías, las β -defensinas y LL-37 podrían evitar la colonización del epitelio por unos microorganismos patógenos. Así, están fuertemente expresadas a nivel de lesiones psoriásicas, en las que se detectan muy raramente, unas sobreinfecciones por unos microorganismos. Al contrario, en el caso de otras patologías como la dermatitis atópica (DA), frecuentemente acompañada de sobreinfecciones por *S. aureus* por ejemplo, estos péptidos no están expresados (Ong *et al.*, 2002). Así, la ausencia o la inactivación de la expresión de estos péptidos puede llevar a unas sobreinfecciones al final de patologías epiteliales diversas. En este caso, siendo la expresión endógena de los péptidos HBD-2, HBD-3 y LL-37 potencialmente inducible a nivel de diversos epitelios (cutáneo, gingival, nasal, vaginal, tracto respiratorio, etc.) (Kao *et al.*, 2004; Krisanaprakornkit *et al.*, 2002), la estimulación local de su síntesis se define como un objetivo potencial de la inducción de la inmunidad innata para aportar una respuesta terapéutica en relación con el ecosistema microbiano y la homeostasis epitelial.

En los individuos sanos, la superficie epitelial de la cavidad oral está regularmente colonizada por diferentes cepas de microorganismos comensales (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) sin que esté por ello infectada por unos microorganismos patógenos. La barrera mecánica, los componentes de la inmunidad adaptativa y de la inmunidad innata, tales como los péptidos antimicrobianos, son responsables del mantenimiento del equilibrio ecológico y de la homeostasis epitelial bucal (Chung WO. y Dale BA, 2004). El espectro antimicrobiano de los péptidos y proteínas segregados por el epitelio oral y las glándulas salivares, su regulación y las condiciones de su producción, definen la microflora de la cavidad oral (Yoshimura A. *et al.*, 2002). La ausencia o la inactivación de estos péptidos están correlacionados frecuentemente a la aparición de patologías parodontales como las parodontitis, que sigue a la colonización por unos patógenos anaerobios gram negativos que liberan numerosos factores de virulencia, tales como *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), o unas infecciones oportunistas como la candidiasis (Feucht EC., *et al.*, 2003).

Por otra parte, estos péptidos funcionarían en una cierta medida manteniendo la flora natural de microorganismos en un estado de equilibrio apropiado a cada nicho ecológico. La microflora comensal desempeña en efecto un papel importante en este entorno limitando la colonización por unos gérmenes patógenos y estimulando las defensas naturales inmunitarias.

Como moléculas de señalización, podrían estimular la respuesta adaptativa después de haber reclutado las células inmunitarias a nivel cutáneo. Así, la solicitante ha considerado que el potencial adyuvante indirecto de los "mono- o di-éster de alquilo de α,β -butilglucósido", por medio de la estimulación de la expresión de los péptidos antimicrobianos catiónicos (hBD-2, hBD-3, y LL-37) a nivel de diferentes epitelios (cutáneo, gingival, vaginal u ocular) puede ser determinado como un refuerzo preventivo del sistema inmunitario de los individuos.

El interés de la solicitante se refiere al estudio del efecto inductor de los "mono- o di-éster de alquilo de α,β -butilglucósido", sobre la expresión de los genes que codifican para los péptidos catiónicos antimicrobianos humanos hBD-2, hBD-3, y LL-37 en comparación con el efecto de citoquinas pro-inflamatorias o de elementos infecciosos, a nivel de modelos celulares (líneas de queratinocitos humanos HaCat, primocultivo de queratinocitos humanos) y de modelos tisulares (explantes cutáneos o gingivales, epitelio gingival reconstruido, mantenidos en supervivencia *in vitro*). Este efecto regulador se ha puesto en evidencia a nivel de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de manera cuantitativa mediante la técnica de transcripción inversa (RT) acoplada a la técnica de reacción de polimerización en cadena (PCR) en tiempo real. De forma complementaria, la síntesis peptídica inducida se ha evaluado cualitativamente por inmunohistoquímica dirigida contra los péptidos hBD-2, hBD-3 y LL-37. En una segunda etapa, se ha analizado el efecto biológico *ex vivo* de los "mono- o di-éster de alquilo de α,β -butilglucósido", sobre la adhesión de una superficie cutánea por *S. aureus* con la ayuda de un modelo de doble compartimento separado.

De acuerdo con la presente invención, se utilizará más particularmente el éster de alquilglucósido constituido por un mono o diéster alquil C_8 - C_{20} de alquil C_1 - C_6 -glucósido, en particular un mono o diéster alquil C_8 - C_{20} de butilglucósido, pudiendo el fragmento éster ser ventajosamente un mono- o di-caprilato, -caprato, -laurato, -palmitato, -miristato, -estearato, -cocoato de α -butilglucósido.

Los alquilglucósidos con una cadena alquilo formada por 8 a 20 átomos de carbono son unos agentes tensioactivos cuyas estructuras y síntesis químicas han sido descritas en la solicitud de patente WO 93/04185.

Se conoce a partir del documento WO 97/45101 que los ésteres de α -alquilglucósido pueden ser utilizados como agente antimicrobiano y/o antifúngico para actuar como conservante en una composición, para preservarla de un desarrollo microbiano. Por otro lado, las propiedades espumantes de los ésteres de metilglucosa se describen en Desai *et al.* («Sofw Journal Seife, Oele, Fette, Wachse, Verlag fur chemische Industrie» 1991).

- Modelo celular: línea celular HaCat, queratinocitos de origen humano, primocultivo de queratinocitos humanos,
- Modelo tisular:
 - Explantes de piel normal que proceden de residuos operatorios de cirugía estética,
 - Explantes de encía normal que proceden de residuos operatorios de cirugía implantaria o de epitelio gingival reconstruido a partir de células epiteliales orales primarias,
 - Las células HaCat son inoculadas y cultivadas en placa de 6 pocillos con 200.000 células/pocillo bajo un volumen de 2 ml de medio de cultivo DMEM 1640: (Ref.: Invitrogen) complementado por el 10% de suero de ternera fetal (SVF, Ref.: CH30160.02 Perbio-Hyclone) durante 18 h (durante la noche).
 - A T0, las células se lavan con tampón fosfato (PBS, Ref.: 52100-039 Invitrogen) y después son privadas de suero para hacerlas quiescentes durante 24 h (disminución de su crecimiento y eliminación de cualquier traza de factores susceptibles de perturbar los efectos inducidos por los tratamientos ulteriores).
 - A T0 + 24 h, las células son tratadas por unas citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α a 10 ng/ml, IL1- β a 10 ng/ml) o elementos bacterianos (LPS a 50 ng/ml, SEB a 100 ng/ml) o unos activos potenciales de tipo «alquilo mono- o di-éster de α,β -butilglucósido» diluidos en DMEM (1 ml/pocillo); La duración del tratamiento es de 3 h a 37°C.
 - Los queratinocitos primarios se preparan a partir de piel normal que procede de residuos operatorios de cirugía estética. Son inoculados y cultivados en placa de 24 pocillos con 60.000 células/pocillo bajo un volumen de 0,5 ml de medio de cultivo KSFM (Ref.: 37010 Invitrogen) complementado por EGF (Epidermal Growth Factor) de 1,5 ng/ml y BPE (bovine pituitary extract) de 25 μ g/ml durante 24 h.
 - A D0, el medio se sustituye por 0,5 ml de medio KSFM completo, adicionado con 1,2 nM de calcio.
 - A D+3, las células son tratadas por unas citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL1- β a 10 ng/ml o unos activos potenciales de tipo "mono o diéster de alquilo de α,β -butilglucósido" diluidos en 0,3 ml de

medio KSFM completo, en presencia de 1,2 nM de calcio. La duración del tratamiento es de 3 h a 37°C.

- 5
- Después de varios lavados en el PBS sin antibióticos, se preparan unas perforaciones de 6 mm de diámetro y se disponen en el fondo de un pocillo de una placa de 12 pocillos.
- 10
- Un tratamiento sistémico del tejido cutáneo que aflora no sumergido se efectúa mediante unas citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α a 500 ng/ml, IL1- β a 100 ng/ml) o unos activos potenciales de tipo "mono o diéster de alquilo de α , β -butilglucósido" diluidos en DMEM (350 μ l/pocillo). Los tiempos de estimulación son variables de 1 h, 15 h o 24 h.
- 15
- En el caso de tratamiento tópico, un anillo de aluminio de 10 mm de diámetro se coloca sobre el explante tisular con el fin de delimitar una superficie epitelial cutánea precisa sobre la cual se efectuará la aplicación tópica. Antes de la aplicación tópica del tratamiento, se efectúa una ruptura de barrera cutánea reversible con la ayuda de un disolvente, la acetona, durante 3 minutos. Los productos diluidos en DMEM se aplican después para una incubación de 2, 5 o 16 h, en paralelo con un control de estimulación de origen bacteriano (SEB a 50 μ g/ml). Después de la incubación, los explantes se aclaran en PBS y son o bien congelados rápidamente en resina Tissue Tek[®] (SAKURA, Zoeterwoude) en nitrógeno líquido (-196°C) para hacer criocortes, o bien conservados a -80°C para realizar unas extracciones de ARN totales.
- 20

Los explantes gingivales humanos de tamaño variable y pequeño son aclarados diez veces en PBS sin antibióticos y después se cultivan sobre una rejilla con el fin de evitar su inmersión total, depositados por el lado de la dermis. La incubación sistémica se realiza en un medio de supervivencia en DMEM solo o en presencia de α , β -LBG bruto a 10 μ g/ml, a 37°C y al 5% de CO₂.

25

Los insertos de epitelio gingival reconstruido se conservan en un medio de mantenimiento (1 ml) en cajas de cultivo celular de 6 pocillos durante 24 h a 37°C y el 5% de CO₂ según las recomendaciones del proveedor SkinEthic Laboratories (Niza, Francia). Después de 24 h, el tejido se estimula por vía tópica por 500 μ l de medio de mantenimiento solo o adicionado con α , β -LBG bruto a 10 μ g/ml, a 37°C y al 5% de CO₂. Se añade un medio de mantenimiento debajo del inserto (1 ml) durante la estimulación. Después del corte con una perforación de 3 mm de diámetro y de su inclusión en la resina Tissue Tek[®], el resto del tejido se conserva a -80°C para una extracción de los ARN totales.

30

Todas las manipulaciones referidas a los ARN se realizan con agua, tampones y un material consumible desprovistos de ARNasas.

35

- A partir de las células:
- 40
- En la interrupción del tratamiento, las células son lavadas rápidamente con PBS y recogidas en el tampón de lisis del kit de extracción Qiagen Rneasy[®]. El protocolo de extracción de los ARN totales se realiza con el kit según las recomendaciones del proveedor (Ref.: 74106 Qiagen). Los ARN se recogen en agua sin ARNasa (Ref.: 0685101 Eppendorf) y se conservan a -80°C.

- A partir de los explantes tisulares:
- 45
- En la interrupción del tratamiento, los explantes son lavados rápidamente con PBS, escurridos y transferidos a un microtubo para centrifugar sin ARNasa de 1,5 ml (Eppendorf), sumergido a su vez en nitrógeno líquido para congelación y conservación a -80°C. Una primera etapa consiste en triturar el tejido en frío mecánicamente con la ayuda de un mortero y de una maja de acero inoxidable (Compañía Pasquet, Toulouse) para obtener un polvo fino. El triturado se recoge después en el tampón de lisis del kit de extracción Qiagen Rneasy[®] y se extrae el ARN total según las recomendaciones del proveedor. Los ARN se recogen en agua sin ARNasa y se conservan a -80°C.
- 50

- Dosificación de los ARN totales:
- 55
- Se efectúa con la ayuda del kit RNA 6000 Nano LabChip[®] (Ref.: 5065-4476 Agilent Technologies) sobre el Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) según las indicaciones del proveedor. El análisis de los datos se efectúa con la ayuda del programa de análisis "Agilent Bioanalyzer 2100 software screen" (Agilent Technologies). Este kit permite cuantificar y controlar el grado de pureza de los ARN frente al ADN genómico y de las proteínas. Cada muestra se deposita en un pocillo sobre una microplaqueta (12 por microplaqueta). Los ARN totales se separan por electroforesis y se visualizan gracias a un agente intercalante fluorescente. En el caso presente, la visualización de los ARN 18S y 28S eucariotas y la relación ARN 28S/ARN 18S permite estimar la no degradación de los ARN.
- 60

- Se utiliza 1 μ g de los ARN totales como muestra con el fin de ser transformado en ADN complementario
- 65

(utilizable para la reacción de polimerización en cadena o PCR) según el protocolo de transcripción inversa o RT. Los ARN son desnaturalizados durante 2 minutos a 95°C y después se añaden la mezcla de RT que contiene la enzima de transcripción inversa (AMV Reverse Transcriptase), los cebadores oligo-dT, los nucleótidos y el tampón. Estos productos proceden del kit Acces RT-PCR Core Reagents (Ref. A3500, Promega). La RT se realiza a 42°C durante 60 minutos y después se desnaturaliza la enzima a 95°C durante 2 minutos. Los ADNc obtenidos se conservan a -20°C.

- Los análisis de PCR en tiempo real se efectúan con la ayuda del termociclador de fluorescencia Icyler IQ (Biorad).

Esta técnica permite visualizar ciclo tras ciclo la acumulación de producto de PCR marcado con fluorescencia. Los ADNc que corresponden a 1 µg de ARN sirven de matriz en una mezcla de reacción de 26 µl que contiene la mezcla de PCR iQ™ SYBR® Green SuperMix (Ref.: 170-8882, Biorad) y 0,3 µM de cada cebador.

Como complemento de las muestras, un control sin matriz de ADNc se deposita sobre una placa de 96 pocillos. Para cada muestra, la amplificación de los diferentes genes de interés, hBD-2, hBD-3 y LL-37, se realiza en duplicado en placa de 96 pocillos, así como la amplificación paralela de tres genes de referencia seleccionados por su estabilidad durante los diferentes tratamientos. Los genes de referencia utilizados son los que codifican para YWHAZ (Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide), GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), y HPRT (human hypoxantine ribosyl transferase) o β₂-M (Human β₂-microglobuline) (tabla 1). Las secuencias de los cebadores utilizadas para la amplificación de estos tres genes por PCR en tiempo real están descritas por Vandesompele J. *et al.* (2002).

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes de referencia por PCR en tiempo real.

Genes de referencia		Cebadores
Human hypoxantine ribosyl transferase	HPRT	Sentido 5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3' Antisentido 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'
Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Sentido 5'-TGCACCACTGCTTA-3' Antisentido 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'
Human β ₂ -microglobuline	β ₂ -M	Sentido 5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3' Antisentido 5'-ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG-3*
tyrosine-3-mono-oxygenase, tryptophane-5-mono-oxygenase activation protein zeta polypeptide	YWHAZ	Sentido 5'-ACT TTT GGT ACA TTG TGG CTT CAA-3' Antisentido 5'-CCG CCA GGA CAA ACC AGT AT-3'

La placa se incuba en el termociclador para las diferentes etapas de PCR. Durante la amplificación, la emisión de fluorescencia se registra al final de cada ciclo y se analiza por el programa iCycler (versión 3.0 BioRad). El aumento de la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de productos de PCR acumulada, que es en realidad proporcional a la cantidad de ARNm que corresponde a la secuencia amplificada. Los resultados son evaluados con el programa iCycler IQ optical system (versión 3.0, BioRad). Para cada par de cebador, se verifica la eficacia de PCR.

Las secuencias de los cebadores para la amplificación de los ARNm de hBD-2, hBD-3 y LL-37 se han dibujado con el programa Beacon Designer Software (versión 2.1, Biorad).

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes hBD-2, hBD-3 y LL-37 en PCR en tiempo real.

Genes de interés		Cebadores
beta-defensina 2 humana	HBD-2	Sentido 5'-CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT-3' Antisentido 5'-GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA-3'
beta-defensina 3 humana	HBD-3	Sentido 5'-TAG GGA GCT CTG CCT TAC CA-3' Antisentido 5'-CAC GCT GAG ACT GGA TGA AA-3'
catelicidina humana	LL-37	Sentido 5'-CCA AGC AGT CAC CAG AGG ATT G-3' Antisentido 5'-GGC CTG GTT GAG GGT CAC T-3'

Para cada muestra, el nivel de expresión de cada gen de interés (hBD-2, hBD-3 y LL-37) se normaliza después con respecto al nivel de expresión de los genes de referencia no inducidos por los diferentes tratamientos con la ayuda del programa Genorm versión 3.2c (Vandesompele *et al.*, 2002).

Después de la normalización, la inducción relativa al nivel transcripcional (ARNm) de los genes que codifican para las β-defensinas hBD-2 y hBD-3 y la catelicidina LL-37 se da con respecto a un control absoluto no inducido (medio sólo).

Las muestras incluidas en la resina Tissue Tek[®] son cortadas en frío (temperatura de la cámara a -25°C y la temperatura del portaobjetos a -28°C) con la ayuda de un criostato (Leica CM 3050s, Nussloch). Los criocortes de un grosor de 5 µm son recuperados sobre unas láminas portaobjetos pretratadas, y después puestos a secar aproximadamente 2 h a temperatura ambiente y almacenados a -20°C para una utilización ulterior. Antes de realizar el inmunomarcado, los cortes son fijados con acetona a -20°C durante 10 min., secados y conservados a -20°C. Durante una primera etapa, los cortes son hidratados y después incubados con los anticuerpos primarios dirigidos contra los péptidos de interés diluidos en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados son los siguientes:

- Goat Anti-human BD-2 (500-P161G, Peprotech Inc) diluido al 1/50^a
- Rabbit Anti-human defensin-3 (AB3478, Chemicon international) diluido al 1/1000
- Rabbit Anti-human LL37 (G-075-06, Phoenix Pharmaceuticals Inc) diluido al 1/50

Para revelar el complejo antígeno-anticuerpo, se utiliza el kit DAKO LSAB[®] (DAKO Corporation) según las recomendaciones del proveedor. La revelación se realiza con la ayuda de un sustrato de peroxidasa: la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAKO Corporation). La reacción enzimática se revela por una coloración marrón.

- La adhesión de los microorganismos se realiza en una célula de doble compartimentación, de tipo célula de Franz modificada.
- Una suspensión de *S. aureus* (CIP 53.154) equivalente a 0,5·10⁷ microorganismos se introduce dentro del compartimento superior de la célula. El dispositivo se incuba durante 2 h a 37°C bajo una atmósfera con el 5% de CO₂. Al final de este periodo de incubación, el sobrenadante se retira con el fin de eliminar las bacterias no adherentes. Las muestras de piel son después aclaradas dos veces con 1 ml de mezcla DMEM/HAMF12. Un recuento bacteriano al final de esta etapa da la proporción de bacterias que se han adherido al explante (T+2 h). Se realiza un control con el objetivo de determinar la adhesión no específica de las bacterias.
- La estimulación de la expresión de las β-defensinas cutáneas precede a la etapa de adhesión. Su objetivo es estudiar el impacto de la inducción de los péptidos antimicrobianos por unos activos potenciales de tipo "mono o diéster de alquilo de α,β-butilglucósido" sobre la adhesión de cepas bacterianas. El tratamiento se efectúa por vía tópica o sistémica. El tiempo de estimulación de los explantes cutáneos es de 24 h a 37°C en presencia del 5% de CO₂.

Para el análisis, los explantes son retirados de su célula, se efectúan unas perforaciones de diámetros diferentes (3 mm, 4 mm y 6 mm) para un ensayo MTT de supervivencia, los marcados inmuno-histológicos y los análisis de los transcritos por RT-PCR. El resto de la piel se utiliza para una estimación de la flora bacteriana adherente.

Para la mayoría de las preparaciones ensayadas, la concentración límite a partir de la cual se ha podido poner en evidencia una citotoxicidad de las preparaciones de mono- o diéster de alquilo de α,β-butilglucósido en el linaje de queratinocitos HaCat mediante el método del rojo neutro después de 24 h de incubación es de 1,10-2%, es decir 100 µg/ml.

En las concentraciones eficaces para la inducción de la expresión de los péptidos hBD-2 y hBD-3, los mono- o diéster de alquilo de α,β-butilglucósido no conllevan un aumento de la liberación de metabolitos pro-inflamatorios derivados del ácido araquidónico, por las células epiteliales cutáneas (línea queratinocitaria HaCat). Estas preparaciones no son consideradas por lo tanto como pro-inflamatorias.

La inducción de la expresión del gen hBD-2 se ha cuantificado a nivel de los ARNm específicos transcritos por la línea de queratinocitos humanos HaCat, normalizada con respecto a la expresión constitutiva de tres genes de referencia estables (HPRT, GAPDH, YWHAZ) en las condiciones de tratamiento ensayadas, citadas en la tabla 3. El método de RT-PCR cuantitativo utilizado se describe en Material y Método. El nivel de inducción se calcula con respecto al control no estimulado tratado en las mismas condiciones, salvo el agente estimulante.

Tabla 3: Actividad de las α,β-LBG sobre la inducción de la expresión del gen que codifica para hBD-2 en las células HaCat después de 3 h de tratamiento: cuantificación de los ARNm específicos por PCR en tiempo real y determinación de un nivel de inducción normalizado con respecto al control celular no estimulado.

Tratamientos		Factor de inducción (FI)
Control no estimulado		1
TNF-α 10 ng/ml		2,5
Productos de partida	α,β-butilglucósido 10-1-0,1 pg/ml	1-1-0,6
	Ácido láurico 10 µg/ml	1,1
α,β-LBG bruto 10 µg/ml		1,7

El éster de laurato, α,β-LBG bruto de 10 µg/ml puro al 48,6%, incluyendo el 90% de la forma α-LBG y el 10% de

forma β -LBG, es activo sobre la inducción de la síntesis del péptido hBD-2 a nivel transcripcional con un factor de inducción (FI) de 1,7 con respecto al control no estimulado, en comparación con un factor 2,5 para el TNF- α . Se ha verificado paralelamente que los productos de partida α,β -butilglucósido y el ácido láurico utilizados durante la síntesis enzimática de este agente no provocaban una inducción de la síntesis del péptido hBD-2, ya que el 5,6% de ácido láurico residual se encuentra todavía en esta preparación.

La inducción de la expresión del gen hBD-2 se cuantificó por RT-PCR cuantitativa a nivel de los ARNm específicos transcritos por unas líneas primarias de queratinocitos humanos procedentes de dos donantes diferentes. Los resultados son normalizados con respecto a la expresión constitutiva de tres genes de referencia estables (HPRT, GAPDH, YWHAZ) en las condiciones de tratamiento ensayadas. El nivel de inducción se calcula con respecto al control no estimulado tratado en las mismas condiciones, salvo el agente estimulante.

A la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, el éster de laurato de butilglucósido puro al 90%, constituido únicamente por la isoforma β , presenta una mejor actividad de inducción de la expresión del gen hBD-2 (FI a 2,3) que el éster de laurato α,β -LBG puro al 90% constituido por el 5% de la isoforma α y por el 44% de la isoforma β (FI a 1,4) y el éster de laurato puro al 90%, constituido únicamente por la isoforma α (FI a 1,2).

La figura 1 adjunta ilustra la actividad de las diferentes isoformas de LBG sobre la inducción de la expresión del gen hBD-2 en los queratinocitos primarios humanos después de 3 h de tratamiento: cuantificación de los ARNm específicos por PCR cuantitativa en tiempo real y determinación de un nivel de inducción normalizado, con respecto al control celular no estimulado (control NS).

Las células primarias NHK aparecen más sensibles a la estimulación por α,β -LBG. A partir de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, una inducción del gen hBD-2 aparece significativa mientras que son necesarios 10 $\mu\text{g/ml}$ para obtener una respuesta de la línea HaCat.

El potencial inductor del éster de laurato, α,β -LBG bruto se analizó sobre un explante cutáneo mediante adición del tratamiento en el medio de cultivo, "vía sistémica", o después de la aplicación tópica del agente "vía tópica".

Tratamiento por vía sistémica

- La inducción de la expresión del gen hBD-2 se ha cuantificado a nivel de los ARNm específicos transcritos por las células epiteliales cutáneas dentro de explantes de piel incubados de manera sistémica en presencia de TNF α de 100 ng/ml, de α,β -LBG bruto de 3 y 30 $\mu\text{g/ml}$. Las variaciones de expresión del gen hBD-2 han sido normalizadas con respecto a la expresión constitutiva de tres genes de referencia estables (β -2M, GAPDH, YWHAZ). El nivel de inducción se calcula con respecto al control tisular no estimulado tratado en las mismas condiciones, salvo el agente estimulante.

La figura 2 adjunta ilustra la cinética de inducción de la expresión del gen hBD-2 dentro de un explante cutáneo por α,β -LBG bruto a diferentes concentraciones, por vía sistémica: cuantificación de la síntesis de los transcritos de hBD-2 por RT-PCR en tiempo real.

Como para el modelo celular, se muestra que este agente en forma bruta de 30 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de inducir la síntesis de los transcritos de hBD-2 a nivel del epitelio cutáneo después de una incubación con la piel por vía sistémica.

Además, el estudio cinético muestra que esta inducción es rápidamente efectiva, a partir de 1 h de incubación. El pico de inducción del TNF α es un poco más precoz con 1 h de incubación.

- La inducción de la expresión de los genes hBD-3 y LL-37 a nivel de un explante cutáneo después del tratamiento por vía sistémica durante 2 o 24 h por α,β -LBG bruto de 30 $\mu\text{g/ml}$ ha sido cuantificada a nivel de los transcritos de los dos péptidos.

La figura 3 adjunta ilustra la cinética de inducción de la expresión de los genes que codifican para hBD-3 y LL-37 dentro de un explante cutáneo, por α,β -LBG bruto a diferentes concentraciones por vía sistémica: cuantificación de la síntesis de los transcritos por RT-PCR cuantitativa.

Estos resultados muestran que α,β -LBG bruto de 30 $\mu\text{g/ml}$ induce la síntesis de los transcritos de hBD-3 sobre un tiempo corto de 2 h con una fuerte disminución de la inducción a 24 h (disminuyendo FI de 17 a 3) según una cinética parecida a la de hBD-2. En lo que se refiere al péptido LL-37, su inducción por α,β -LBG bruto a 30 $\mu\text{g/ml}$ es efectiva a partir de 2 h de tratamiento con un FI de 6 que permanece estable hasta 24 h.

- El análisis cualitativo de la expresión peptídica por inmunohistoquímica a partir de los explantes estimulados por vía sistémica ha permitido confirmar la estimulación de la producción de los péptidos hBD-2 y hBD-3 en las capas superiores de la epidermis después de la estimulación por α,β -LBG bruto durante 24 h. La figura 4 adjunta corresponde a las fotos inmunohistológicas.

- La inducción de la expresión del gen hBD-2 ha sido cuantificada a nivel de los ARNm específicos transcritos por las células epiteliales cutáneas dentro de explantes de piel tras la incubación tópica de α,β -LBG bruto a 30 y 300 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con el control de estimulación, la toxina bacteriana SEB a 50 $\mu\text{g/ml}$.

5 La figura 5 adjunta ilustra la inducción de la expresión del gen hBD-2 dentro de un explante cutáneo por α,β -LBG bruto a diferentes concentraciones por vía tópica durante 5 h: cuantificación de la síntesis de los transcritos de hBD-2 por RT-PCR cuantitativa.

10 Estos resultados muestran que α,β -LBG en su forma bruta es capaz de inducir por vía tópica la síntesis de los transcritos de hBD-2 a nivel del epitelio cutáneo a partir de la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$, FI de 5,2 y, en una menor medida, a una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, FI de 1,7. Para comparación, SEB presenta una actividad del mismo orden que la de α,β -LBG (300 $\mu\text{g/ml}$) con FI de 1,9. Además, esta inducción es efectiva a partir de 5 h de incubación.

- El análisis cualitativo de la expresión peptídica por inmunohistoquímica a partir de los explantes estimulados por vía tópica ha permitido confirmar cualitativamente la estimulación de la producción de los péptidos hBD-2 y hBD-3 en las capas superiores de la epidermis después de la estimulación por α,β -LBG. La figura 6 adjunta corresponde a las fotos inmunohistológicas.

20 El potencial inductor de las isoformas del éster de laurato de butilglucósido puro al 90%, separadas, α sola o β sola, o en mezcla α,β -LBG (56% α /44% β) se ha comparado sobre explante cutáneo por vía sistémica o tópica.

- La inducción de la expresión del gen hBD-2 ha sido cuantificada a nivel de los ARNm específicos transcritos por las células epiteliales cutáneas dentro de explantes de piel incubados de manera sistémica en presencia de TNF α a 500 ng/ml, de IL1- β a 100 ng/ml, de α,β -LBG puro, de α -LBG o de β -LBG puro a 3 $\mu\text{g/ml}$ para una duración de tratamiento de 2 h o de 15 h.

30 La figura 7 adjunta ilustra la cinética de inducción por vía sistémica durante 2 y 15 h de la expresión del gen hBD-2 dentro de un explante cutáneo por α,β -LBG puro a 3 $\mu\text{g/ml}$: comparación de las formas α,β (ab), α (a) y β (b) LBG; cuantificación de la síntesis de los transcritos de hBD-2.

35 A una concentración dada idéntica, 3 $\mu\text{g/ml}$, las isoformas en mezcla α,β -LBG puro a 3 $\mu\text{g/ml}$ presentan un potencial inductor significativo, sobre todo después de una duración larga de tratamiento. Tras la separación, la isoforma β -LBG pura a 3 $\mu\text{g/ml}$, aislada a más del 95% frente a la isoforma α -LBG es más activa que la mezcla a partir de 2 h de tratamiento (FI de 5,7 contra 1,1). A la inversa, la isoforma α -LBG pura no presenta ninguna actividad a esta misma concentración sobre la inducción de la expresión del gen hBD-2 en las células epiteliales cutáneas, incluso después de un tratamiento largo de 15 h.

40 En las presentes condiciones experimentales, estos resultados muestran que la isoforma β -LBG sería el origen de la actividad farmacológica inductora de la expresión del gen hBD-2.

Por vía tópica

- La inducción de la expresión del gen hBD-2 ha sido cuantificada a nivel de los ARNm específicos transcritos por las células epiteliales cutáneas dentro de explantes de piel incubados de manera tópica en presencia de α,β -LBG puro, de α -LBG o de β -LBG puro a 3 o 30 $\mu\text{g/ml}$ para una duración de tratamiento de 18 h.

50 La figura 8 adjunta ilustra la inducción de la expresión del gen hBD-2 dentro de un explante cutáneo por vía tópica después de 18 h de tratamiento por α,β -LBG puro a 3 o 30 $\mu\text{g/ml}$: comparación de las formas α,β , α y β -LBG; cuantificación de la síntesis de los transcritos de hBD-2 por RT-PCR en tiempo real.

55 Después de 18 h de tratamiento tópico mediante dos concentraciones dadas idénticas, 30 y 3 $\mu\text{g/ml}$, la mezcla α,β -LBG así como las isoformas α y β -LBG puras aisladas inducen una expresión del gen de hBD-2 del mismo orden a nivel de la transcripción (FI entre 1,96 y 2,96). Cuando la concentración disminuye a 3 $\mu\text{g/ml}$, la isoforma β -LBG pura (FI de 13,7), es claramente más activa que la mezcla α,β -LBG pura y que la isoforma α -LBG pura.

En las presentes condiciones experimentales, estos resultados confirman por vía tópica los obtenidos por vía sistémica. La isoforma β -LBG sería el origen de la actividad farmacológica inductora de la expresión del gen hBD-2.

60 El recuento de la flora bacteriana adherente exógena por unidad de superficie de piel se efectuó según dos métodos:

- por recuento bacteriano sobre medio sólido
- por conteo de la radioactividad emitida (estando la cepa contaminante marcada con H³).

65 La comparación de los resultados ha permitido mostrar que no existía ninguna diferencia significativa entre los dos métodos. El análisis por recuento se ha conservado por lo tanto para el ensayo de adhesión de *S. aureus* sobre el tejido cutáneo.

Después de una aplicación tópica de 5 h y varios aclarados de la superficie epidérmica de un explante cutáneo, se ha cuantificado el efecto del tratamiento por α,β -LBG bruto sobre la adhesión de *S. aureus* sobre este mismo explante mediante el recuento de los gérmenes adherentes al final de una puesta en contacto de 2 h.

La figura 9 adjunta representa la actividad de α,β -LBG bruto aplicado por vía tópica a una dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ sobre un explante cutáneo sobre la adhesión de *S. aureus* (A) correlacionada con la inducción de la expresión del gen hBD-2 (B) a nivel de este explante en comparación con el tejido del mismo donante no estimulado (cuantificación de los ARNm específicos por PCR en tiempo real).

Los resultados muestran un efecto regulador significativo del tratamiento por α,β -LBG bruto sobre el número de gérmenes patógenos adherentes con respecto al control no tratado, con una disminución de este número equivalente a una disminución del 20% de la adhesión de *S. aureus* (figura 9A).

Paralelamente, la inducción de la expresión del gen hBD-2 se ha verificado después de 5 h de tratamiento por α,β -LBG bruto. La persistencia de este estado de inducción se ha demostrado después de la etapa de adhesión (2 h) de *S. aureus* con un FI de 3,8 con respecto al control no tratado, pero en cualquier punto idéntico en lo que se refiere a las otras etapas, tales como la adhesión (figura 9B).

Sin haber sido demostrado directamente, sería posible que la inducción de las beta-defensinas pueda estar correlacionada con el efecto de α,β -LBG bruto sobre la funcionalidad del tejido epitelial cutáneo y en particular sobre el reequilibrio de la flora cutánea. Una inhibición específica de esta inducción después del tratamiento podría permitir verificar esta hipótesis.

Aunque se ha verificado que a las concentraciones utilizadas el α,β -LBG bruto no presentaba ni actividad microbiciada directa ni efecto sobre la adhesión de *S. aureus*, se han llevado a cabo unos experimentos con el fin de verificar la naturaleza indirecta de la acción de α,β -LBG sobre la interacción entre *S. aureus* y el epitelio cutáneo. Para ello, se ha separado el compartimento de tratamiento del tejido por α,β -LBG y el compartimento de interacción entre el epitelio cutáneo y el germen patógeno, teniendo lugar el primero en el lado profundo en la epidermis (vía sistémica) y el segundo en la superficie epidérmica (vía tópica).

La figura 10 adjunta ilustra la actividad indirecta de α,β -LBG bruto aplicado por vía sistémica a una dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ sobre un explante cutáneo, sobre la adhesión de *S. aureus* o en comparación con el tejido del mismo donante no estimulado o tratado por TNF α (cuantificación de los ARNm específicos por PRC en tiempo real).

Los resultados de recuento muestran que sin contacto directo con la superficie sobre la cual tiene lugar el contacto ulterior de los microorganismos, el α,β -LBG es capaz de regular la adhesión de los gérmenes sobre el explante (disminución del 11% con respecto al control no estimulado), por medio de la regulación a distancia de la expresión de moléculas antimicrobianas epiteliales. Entre los candidatos moleculares potenciales, las beta-defensinas estimuladas por el α,β -LBG o el TNF- α podrían representar esta relación. Así, la citoquina pro-inflamatoria, el TNF- α , conlleva una fuerte disminución de la adhesión de *S. aureus* correlacionada con una fuerte inducción de las beta-defensinas epiteliales.

Después de la aplicación tópica y de varios aclarados de la superficie epidérmica de los explantes cutáneos, el efecto del tratamiento por las isoformas del éster de laurato de butilglucósido puro al 90%, separados, α sola, β sola, o en mezcla α,β -LBG (56% α /44% β) sobre la adhesión de *S. aureus* sobre la epidermis ha sido comparado después de la cuantificación de los gérmenes adherentes por recuento.

La figura 11 adjunta ilustra la actividad de las diferentes isoformas de LBG puro al 90% aplicadas por vía tópica a una dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ sobre un explante cutáneo sobre la regulación de la adhesión de *S. aureus*: comparación de las formas α y β -LBG y de la mezcla α/β .

Los resultados muestran un efecto regulador del tratamiento por las diferentes preparaciones puras de LBG sobre el número de gérmenes patógenos adherentes con respecto al control no tratado, con una disminución de este número equivalente a una bajada media del orden del 19% de la adhesión de *S. aureus* para la mezcla α,β -LBG pura. En comparación, la isoforma β -LBG pura es de media más activa sobre la limitación de la adhesión de *S. aureus* que la isoforma α -LBG.

Por otra parte, es posible observar la colonización del explante por el germen exógeno (*S. aureus*) después de la etapa de adhesión durante 24 h. Es interesante señalar que el efecto de un tratamiento sistémico por el α,β -LBG bruto ralentiza la multiplicación del germen patógeno y favorece a la inversa el desarrollo de un germen comensal endógeno *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (presente en el explante inicial). Se observa el efecto inverso con el tratamiento por TNF- α , citoquina pro-inflamatoria que, después de conllevar una fuerte caída de la adhesión de *S. aureus* (véase III.4.2) no permite una limitación del crecimiento del germen patógeno sobre el explante, y esto a expensas del germen comensal *S. epidermidis*.

La figura 12 adjunta ilustra la comparación de la colonización de una cepa contaminante, *S. aureus*, con la de una cepa comensal, *S. epidermis*.

5 Estos dos tratamientos parecen por lo tanto perturbar el ecosistema original. Sin embargo, en el caso de α,β -LBG, el desequilibrio inducido por estas estimulaciones está a favor de la cepa comensal.

El éster de laurato, α,β -LBG bruto a 30 $\mu\text{g/ml}$ puro al 48,6%, del cual el 90% de la forma α -LBG y el 10% de la forma β -LBG, se ha ensayado sobre explante gingival por vía sistémica únicamente, siendo la orientación del tejido difícilmente realizable al contrario de los explantes cutáneos después de un tratamiento de 5 h.

10 \triangleright El análisis cualitativo de la expresión peptídica a partir de los explantes estimulados por vía sistémica se realizó por inmuno-histoquímica con un anticuerpo dirigido contra el péptido hBD-3.

15 La figura 13 adjunta ilustra la actividad del α,β -LBG puro sobre la inducción de la expresión del péptido hBD-3 a nivel del epitelio gingival de un donante sano después de 5 h de tratamiento por vía sistémica. Localización del marcado específico hBD-3 en el seno del epitelio tratado por el activo por vía sistémica durante 5 h (B) y comparación con el tejido del mismo donante no estimulado (A).

20 Después del revelado, la comparación de los marcados ha permitido demostrar la inducción de la producción del péptido hBD-3 en las capas superiores del epitelio gingival después del tratamiento del tejido por α,β -LBG.

25 Se señala que, para el epitelio gingival, la expresión de los péptidos antimicrobianos epiteliales varía en gran medida según el donante, no sólo debido a la riqueza de la flora presente dentro del ecosistema bucal, sino también por el hecho del estado fisiológico del epitelio (inflamación gingival, patología parodontal, etc.). La utilización de un modelo tisular epitelial reconstruido a partir de células epiteliales gingivales primarias procedentes de un mismo donante, presenta un interés principal en la evaluación de principios activos.

30 El éster de laurato, α,β -LBG bruto a 30 $\mu\text{g/ml}$ puro al 48,6%, del cual el 90% de la forma α -LBG y el 10% de forma β -LBG, se ha ensayado sobre el epitelio gingival reconstruido (SkinEthic Laboratoires) después de un tratamiento de 18 h por vía tópica o sistémica.

\triangleright La inducción de la expresión del gen hBD-3 ha sido cuantificada a nivel de los ARNm específicos transcritos por las células epiteliales gingivales dentro del epitelio reconstruido.

35 La figura 14 adjunta ilustra la cinética de actividad de α,β -LBG puro sobre la inducción de la expresión del gen que codifica para hBD-3 a nivel de un epitelio gingival reconstruido (SkinEthic Laboratoires): cuantificación de los ARNm específicos por PCR en tiempo real.

40 La cuantificación de los transcritos de hBD-3 demuestra la capacidad de α,β -LBG en su forma bruta para inducir la síntesis de los transcritos de hBD-3 a nivel del epitelio cutáneo por vía tópica a la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a un control no tratado (Nst): a partir de 2 h de tratamiento (FI de 2) y hasta 19 h de incubación (FI de 17,6).

45 \triangleright El análisis cualitativo de la expresión peptídica por inmunohistoquímica a partir de epitelio gingival reconstruido tratado por α,β -LBG bruto en comparación con una muestra no tratada, ha permitido confirmar la producción del péptido hBD-3 por las células de diferentes estratos del epitelio gingival reconstruido y en particular localizar su acumulación en las capas más superficiales.

50 La figura 15 adjunta ilustra la actividad de α,β -LBG puros sobre la inducción de la expresión del péptido hBD-3 a nivel de un epitelio gingival reconstruido (SkinEthic Laboratories): localización del marcado específico del epitelio tratado por el activo por vía sistémica durante 1 h (B) y comparación con el tejido del mismo donante no estimulado (A).

55 Sin embargo, al ser muy rápida la aparición de este marcado, es probable que el péptido no proceda de una neosíntesis del péptido.

En conclusión, el conjunto de los resultados demuestra la actividad farmacológica de los mono- o di-ésteres de alquilo de α,β -butilglucósido sobre la inducción de la expresión de los genes hBD-2, hBD-3 y LL-37 sobre unos modelos celulares y tisulares por vía tópica o sistémica tanto a nivel del epitelio cutáneo como gingival.

60 Por otra parte, los datos de funcionalidad *ex vivo* sobre la adhesión de un germen patógeno exógeno permiten poner en evidencia una actividad reguladora de estas moléculas sobre la flora cutánea y, en particular, sobre el reequilibrio de este ecosistema hacia una flora comensal.

65 Queda por establecer la relación directa entre la estimulación de la expresión de los péptidos antimicrobianos y la regulación de la flora, pero es muy posible debido a la correlación entre la regulación de la flora y la inducción de la expresión de los genes de estos péptidos a nivel epitelial en presencia de α,β -LBG.

Por último, el análisis de la actividad de las diferentes isoformas ha permitido poner en evidencia la superioridad de la isoforma β -LBG frente a la isoforma α -LBG, tanto desde un punto de vista farmacológico *in vitro* como desde un punto de vista de funcionalidad *ex vivo*.

5 Se indicará a continuación un cierto número de ejemplos de composiciones según la invención. En función de su pureza, se utilizan dos tipos de APG.

10 Los primeros son al 70% de laurato de butilglucósido y como son muy viscosos, están diluidos a la mitad con palmitato de octilo. El conjunto constituye un núcleo al 35% aproximadamente de LBG.

Los segundos productos, más purificados, son al 85%, incluso más y se utilizan tal cual.

Ejemplo 1

15

Pasta dentífrica:

Palmitato de octilo/LBG	1 al 5% o LBG 0,5 al 2,5%
Fosfato dicálcico	60%
Glicerina	15%
Goma adragante/Xantana	1%
Perfume	1%
Agua	CSP 100
Agente espumante de tipo laurilsulfato sódico	1%

Ejemplo 2

20

Gel antimicrobiano:

Palmitato de octilo/LBG	1 al 5% o LBG 0,5 al 2,5%
Natrosol HHX 250	1,5%
Digluconato de clorhexidina	0,2%
Alcohol	15% al 20% vol.
Agua desmineralizada	csp 100

Ejemplo 3

25

Crema fría:

Núcleo LBG	1 al 5%
Ceras vegetales	30%
Aceite de almendra dulce	50%
Borato de sodio	0,5%
Fenoxietanol	0,8%
Agua	Csp 100

Ejemplo 4

30

Crema depilatoria:

Núcleo LBG	5%
Gelatina	2%
Tioglicolato de calcio	cs
pH 11,5-12 Agua	csp 100

Ejemplo 5

35

Leche antiséptica:

LBG	2 al 5%
Aceite mineral	10%
Aceite de copra	15%
Éster de sorbitán	20%
Conservantes	1%
Agua	csp 100
Polímero acrílico para estabilizar	csp pH 7

Ejemplo 6

5 Crema de manos:

núcleo LBG	2 al 5%
Aceite de vaselina	
Aceite de silicona	
Glicerina	
Estearato de trietanolamina	
BHT	
Parahidroxibenzoato de metilo	
Perfume	
Agua desmineralizada	Csp 100

Ejemplo 7

10 Jabón líquido:

Núcleo LBG	5%
Aceite de palma	80%
Hidróxido sódico	12%
Glicerina	10%
Perfume	0,5%
Conservante	1%

Referencias bibliográficas

15 Patente WO 93/04185

Chung WO., Hansen SR., Rao D., Dale BA. Protease-Activated Receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J. Immunol.* 2004, 173:5165-5170.

20 Chung WO., Dale BA. Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different pathways by various bacterial species. *Infect. Immun.* 2004, 72: 352-358.

Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Bäckdahl M., Lidén S., Wigzell H., Gudmundsson GH. The expression of the gene encoding for antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 15258-15263.

25 Ganz T. Defensins and host defense, *Science*, 1999, 286, 420-421.

Gordon S. Pattern Recognition Receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell* 2000. 2002, 111: 927-930.

30 Kao CY., Chen Y., Thai P., Wachi S., Huang F., Kim C., Harper RW., Wu R. IL-17 markedly up-regulates β -Defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF- B signaling pathways. *J. Immunol.* 2004, 173: 3482-3491.

35 Koczulla R., von Degenfeld G., Kupatt C., Krötz F., Zahler S., Gloe T., Issbrücker K., Unterberger P., Zaiou M., Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP18. *J. Clin. Invest.* 2003, 111: 1665-1672.

Koczulla A.R. y Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential, *Drugs*, 2003, 63, 389-406.

40 Krisanaprakornkit S., Kimball JR., Dale BA. Regulation of Human p- Defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase pathways, but not the NF-kB transcription factor family. *J.Immunol.* 2002, 168: 316-324.

45 Liu A.Y., Destoumieux D., Wong A.V., Park C.H., Valore E.V., Lju L. et Ganz T. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation, *J. Invest Dermatol.*, 2002, 118,275-281.

Ong Y.P., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., Ganz T., Gallo R.L., y Leung D.Y.M., Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Eng J Med*, 347, No. 15. 2002.

50 Presland RB., Dale BA. Epithelial structural proteins of skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000, 11: 383-408. Scott M. G., Davidson D. J., Gold M. R., Bowdish D., Hancock R. E. W., The

human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 3883-3891.

5 Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. y Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, 2002, 3, RESEARCH I-0034.

10 Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowskj J., Oppenheim J.J. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense, *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, 181-215.

Zaiou M., Nizet V., Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of human Cathelicidin (hCAP18/LL-37). *J Invest. Dermatol.* 2003, 120: 810-816.

15 Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity, *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ésteres de alquilglucósido como principios activos que provocan un reequilibrado de la flora comensal de la piel y de las mucosas y/o una disminución de la adhesión de los microorganismos patógenos sobre el tejido epitelial por inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos endógenos, para su utilización en una composición tópica dermatológica o dermocosmetológica destinada al tratamiento preventivo o curativo de las afecciones microbianas.
- 10 2. Ésteres según la reivindicación 1, caracterizados porque los péptidos antimicrobianos endógenos pertenecen a la familia de las β -defensinas y de las catelicidinas.
3. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizados porque los péptidos antimicrobianos endógenos de la familia de las β -defensinas son entonces HBD-2 y HBD-3.
- 15 4. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados porque el péptido antimicrobiano endógeno de la familia de las catelicidinas es el LL-37.
5. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados porque la composición tópica está destinada a favorecer la homeostasis epitelial para el tratamiento de la dermatitis atópica.
- 20 6. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizados porque la composición está destinada a favorecer la homeostasis epitelial para el tratamiento de afecciones oftálmicas.
7. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizados porque la composición está destinada a favorecer la homeostasis epitelial para el tratamiento de afecciones gingivales.
- 25 8. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizados porque la composición está destinada a favorecer la homeostasis epitelial en el tratamiento de afecciones vaginales.
- 30 9. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizados porque el éster de alquilglucósido es un mono- o di-éster de alquilo de C_8 - C_{20} de alquil C_1 - C_6 -glucósido.
10. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizados porque el éster de alquilglucósido es un mono- o di-éster de alquilo de C_8 - C_{20} de butilglucósido.
- 35 11. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizados porque el éster de alquilglucósido es un mono- o di-caprilato, -caprato, -laurato, -palmitato, -miristato, -estearato, -cocoato de α -butilglucósido.
- 40 12. Ésteres según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizados porque el éster de alquilglucósido es el laurato de α -butilglucósido, preferentemente diluido en el palmitato de octilo.

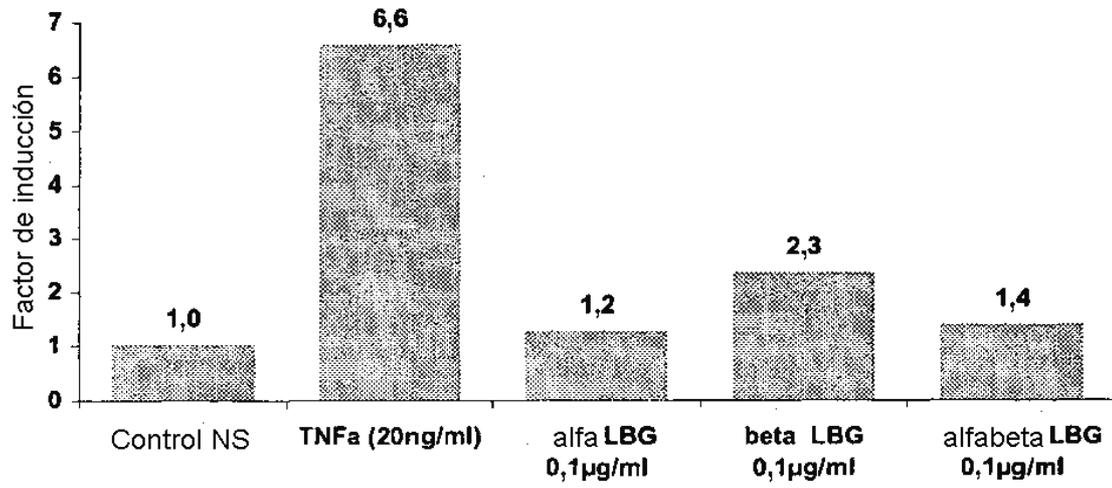


Figura 1

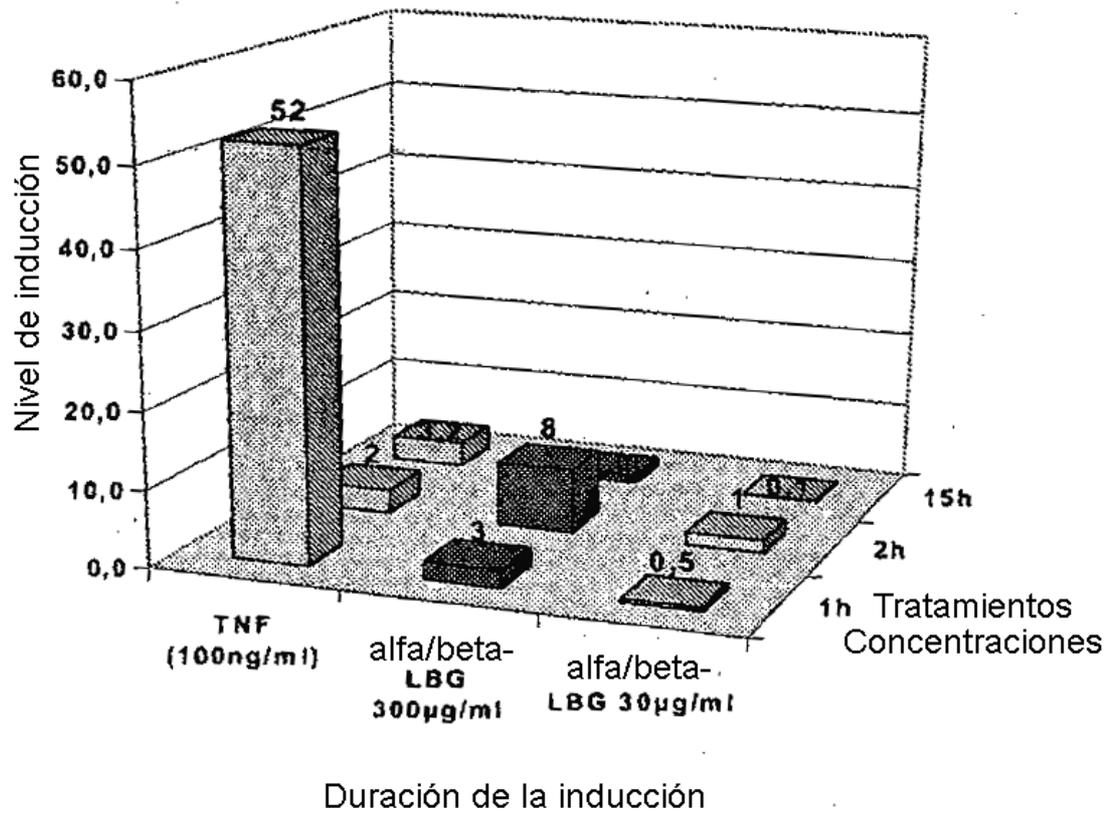


Figura 2

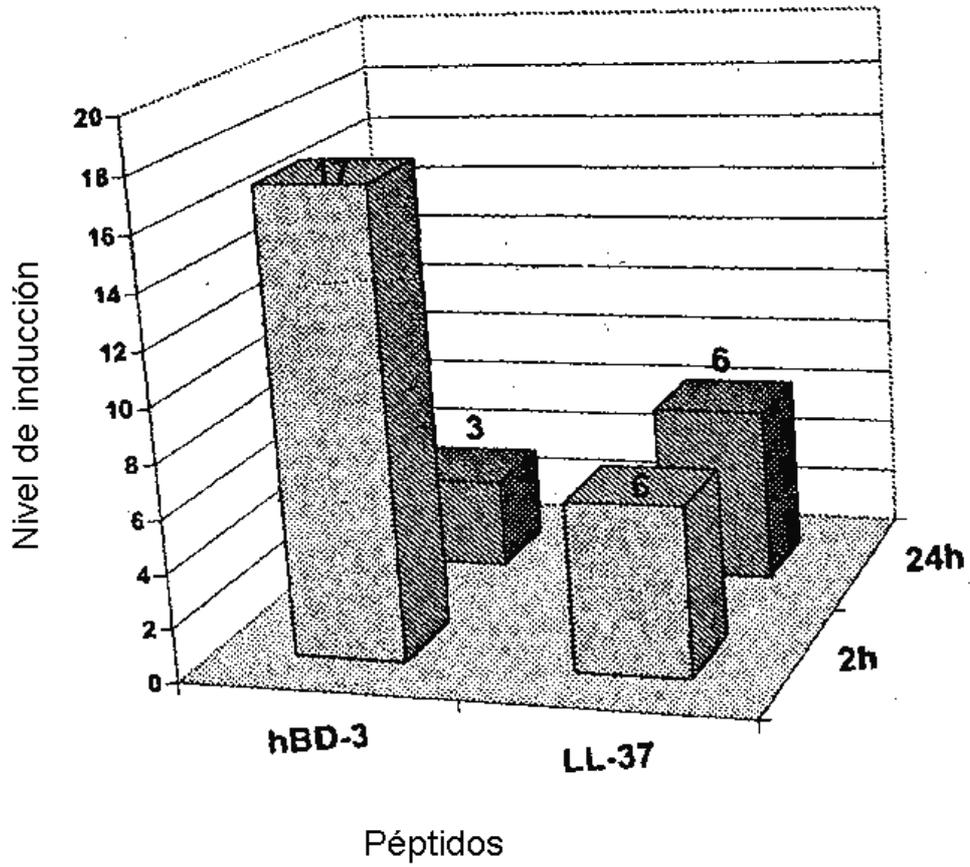


Figura 3

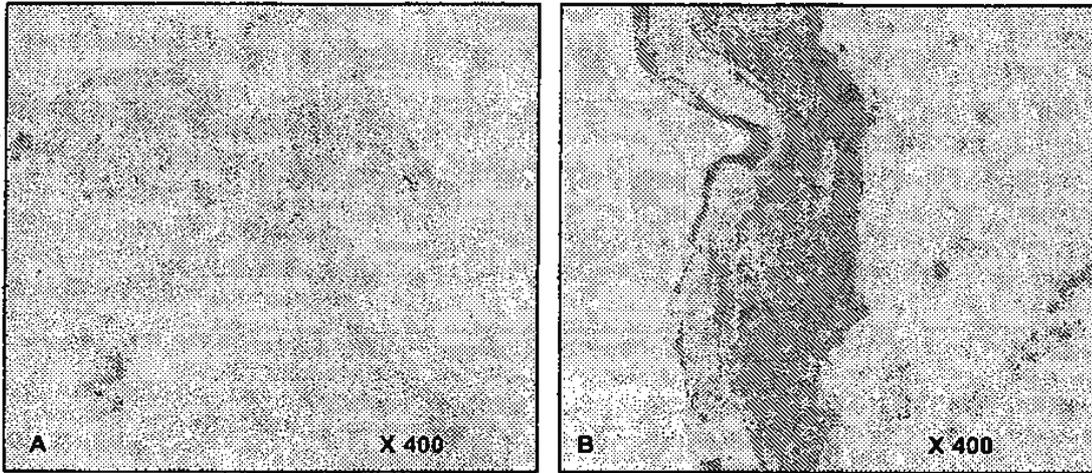


Figura 4

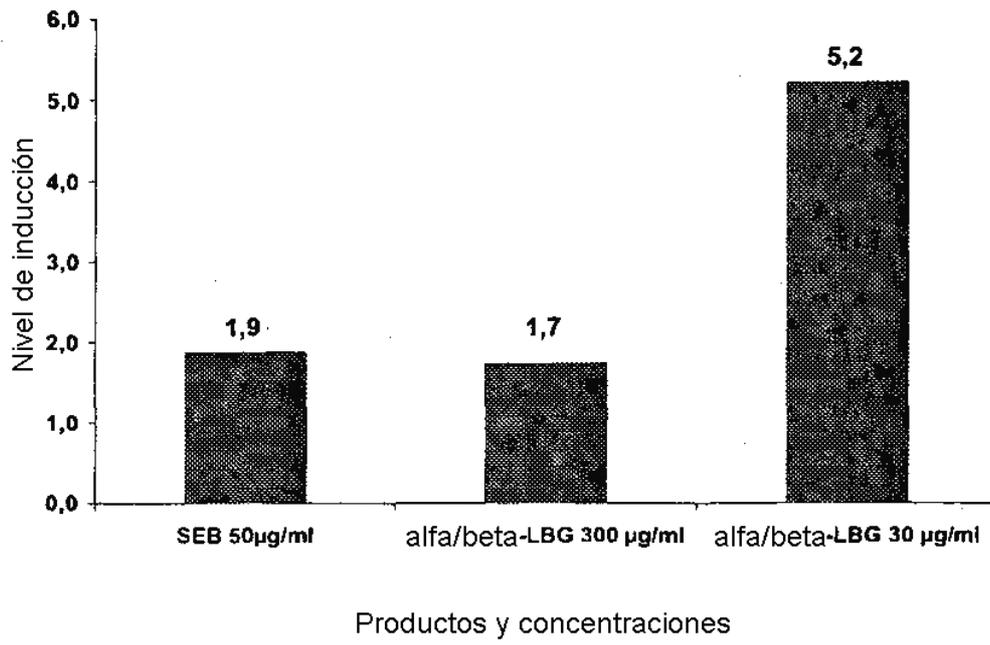


Figura 5

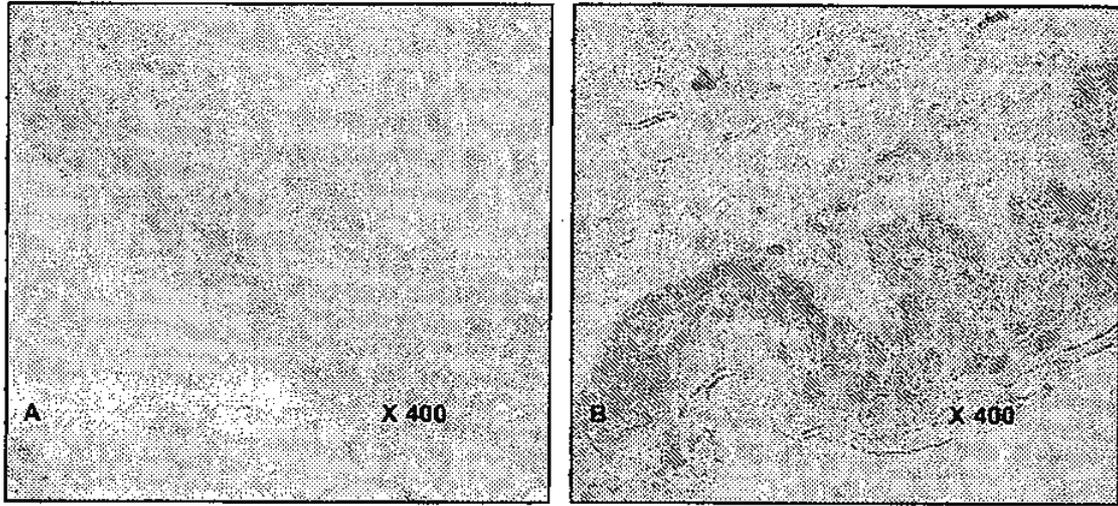


Figura 6

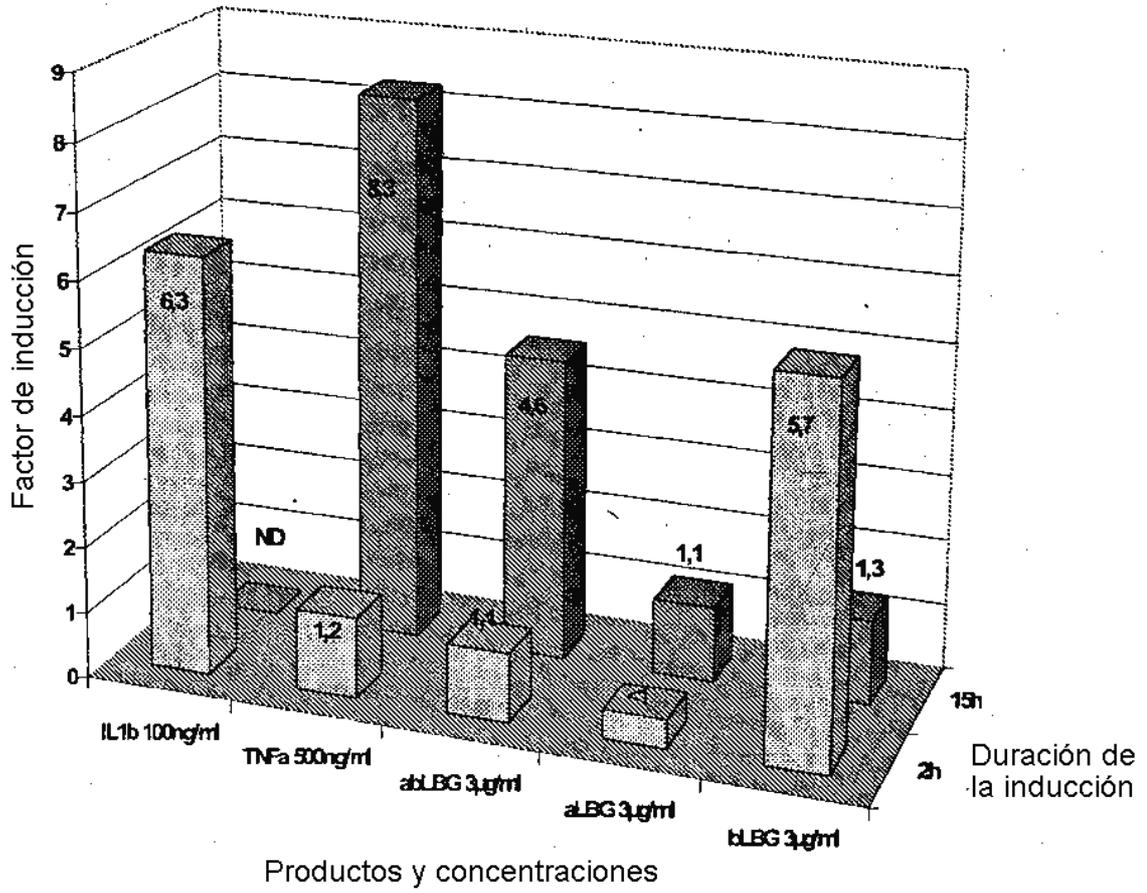


Figura 7

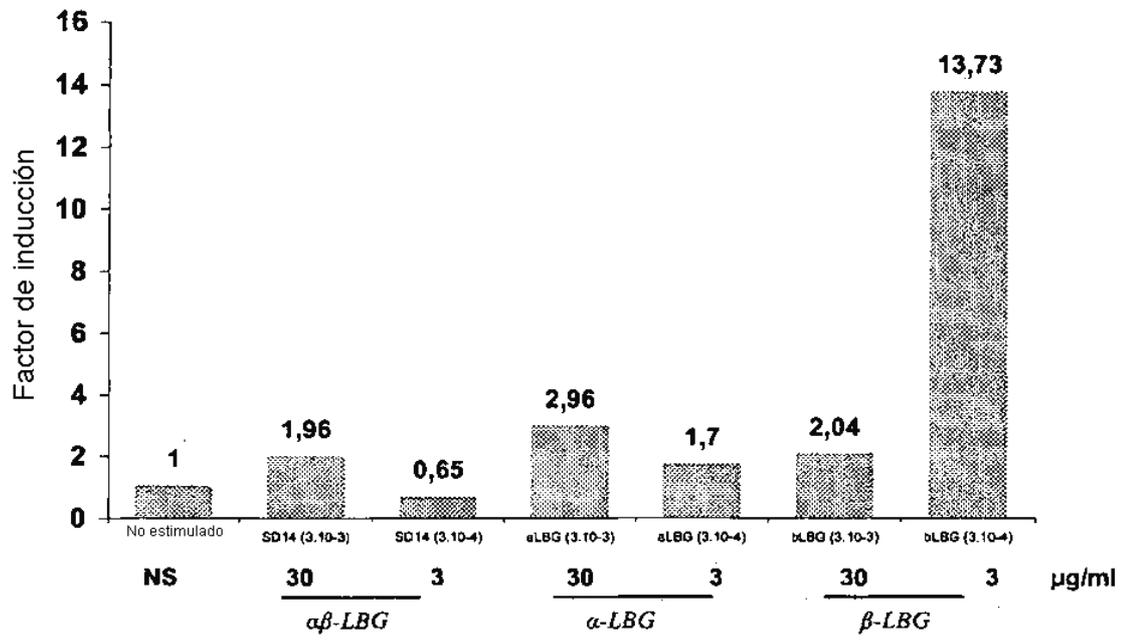
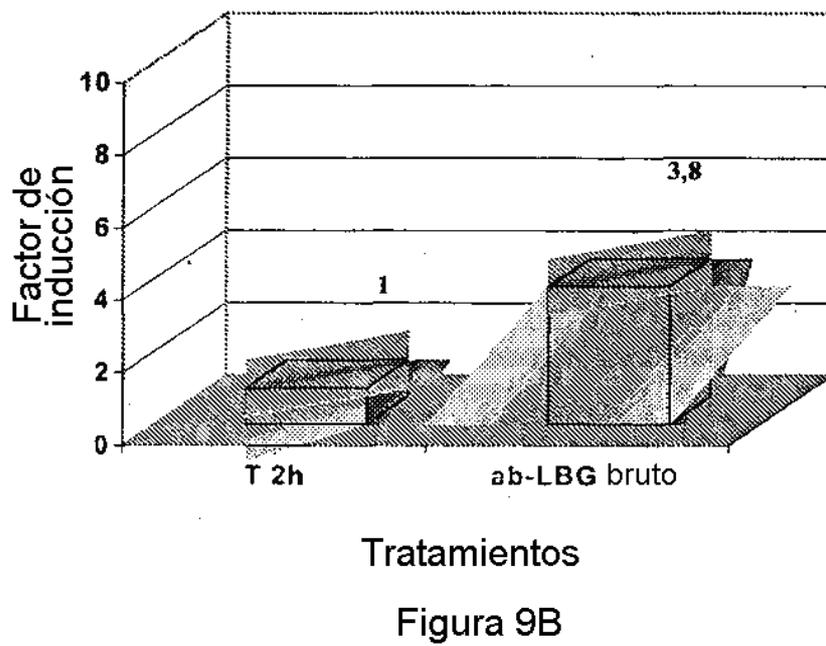
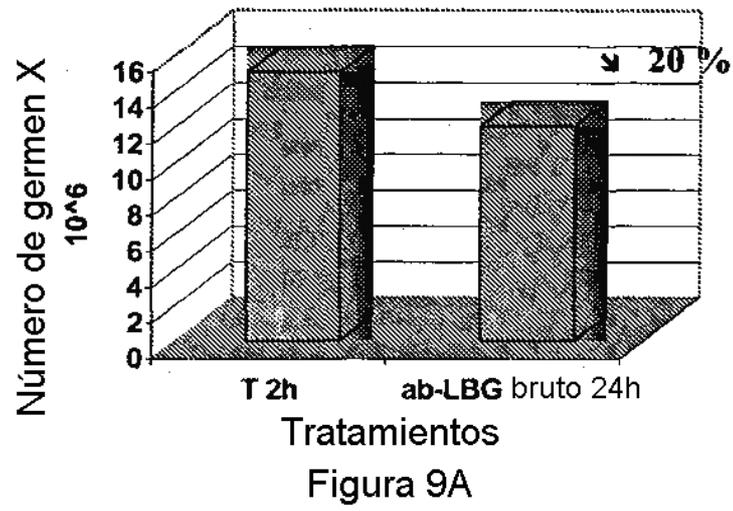


Figura 8



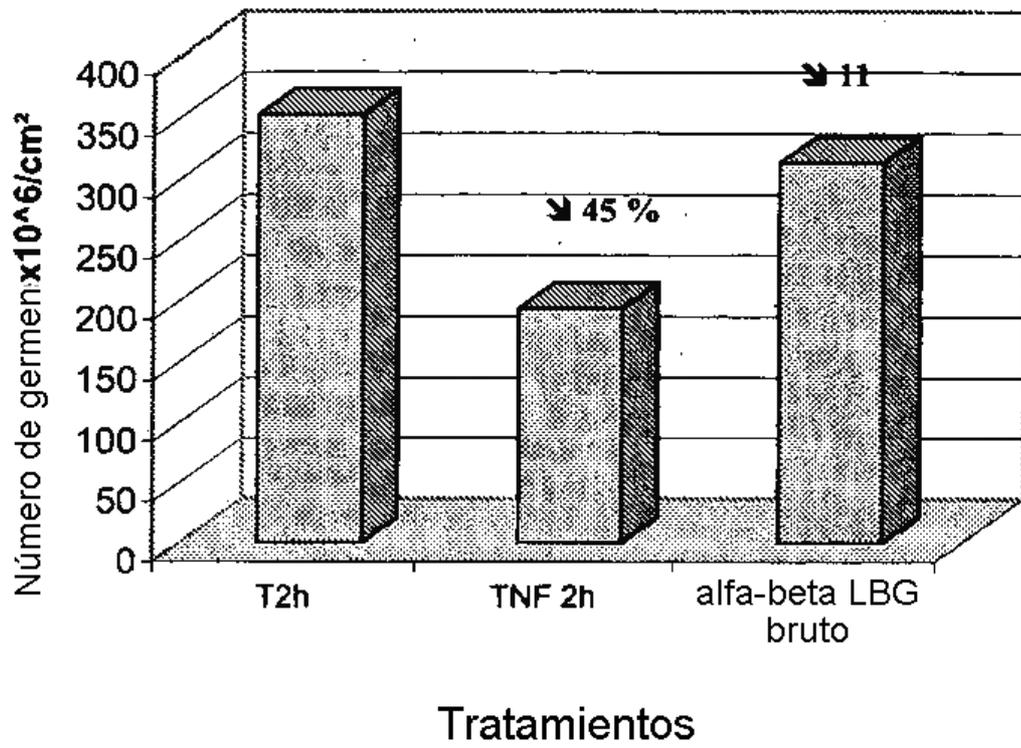


Figura 10

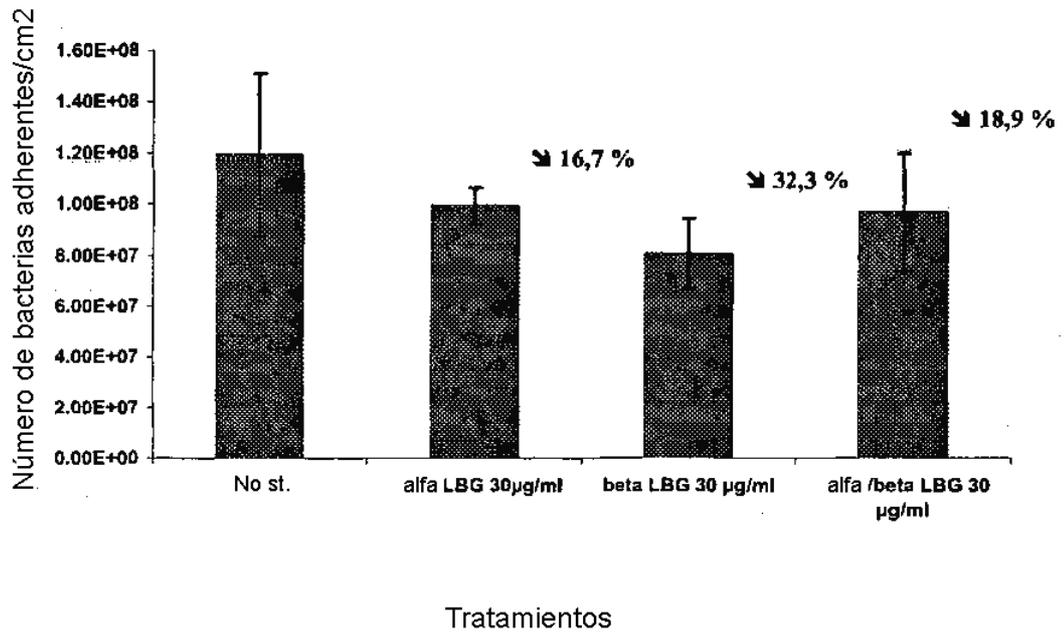


Figura 11

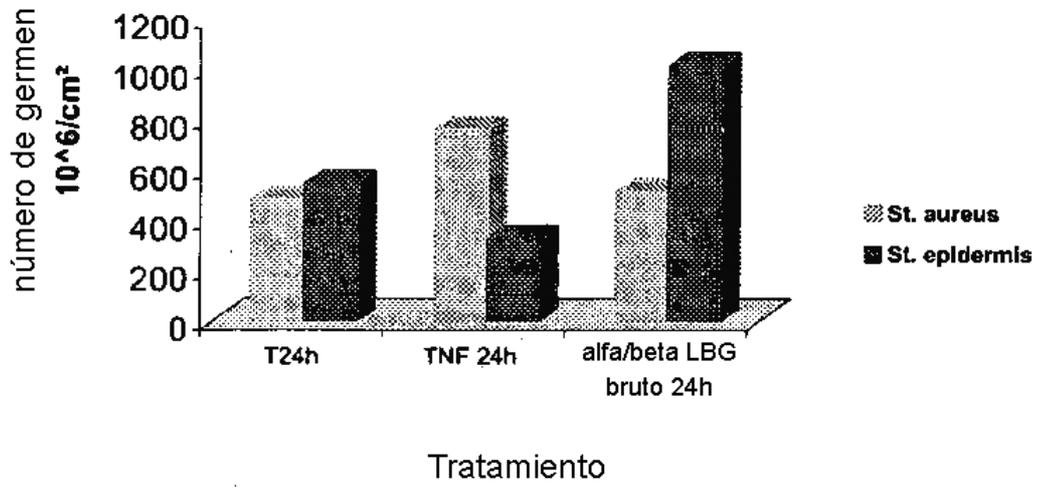


Figura 12

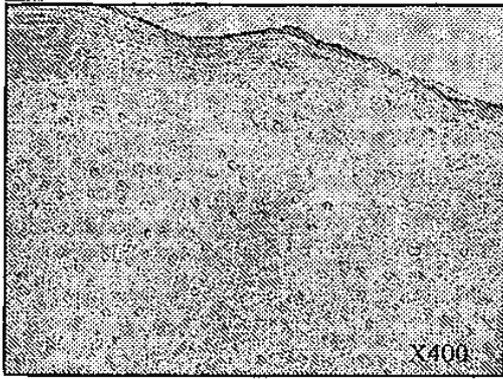


Figura 13A



Figura 13B

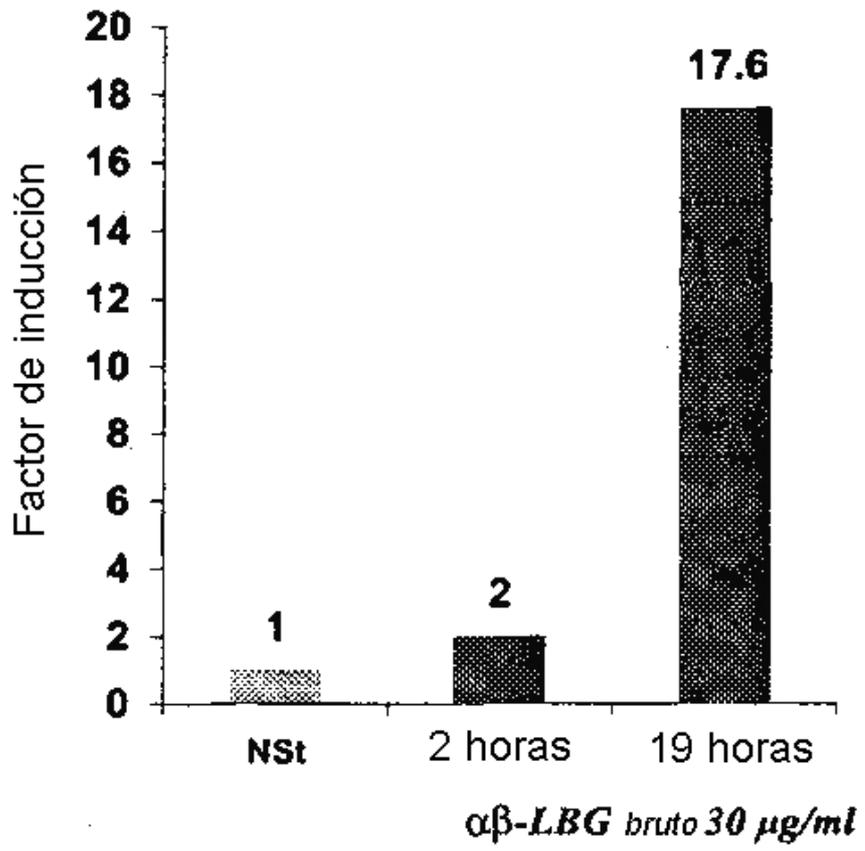
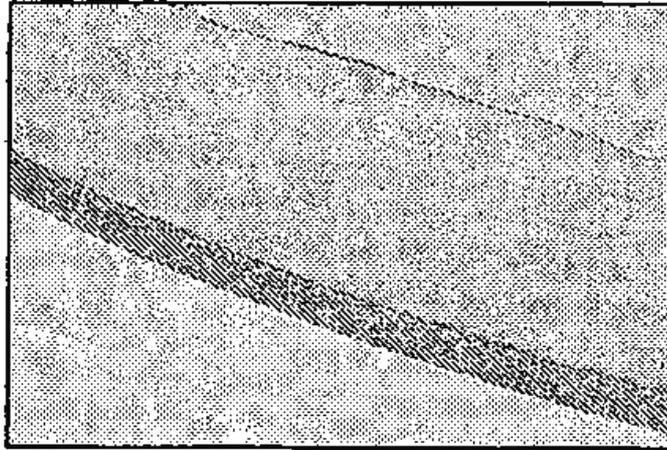
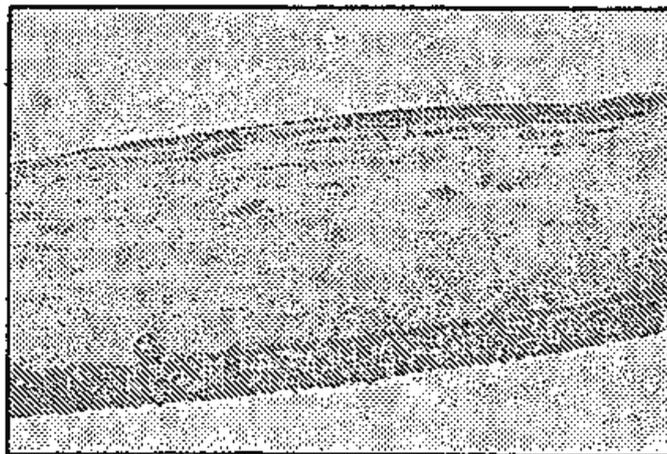


Figura 14



X200

Figura 15A



X 200

Figura 15B