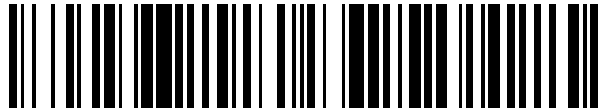


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 694**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2007 E 09168105 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2124058**

54 Título: **Método de diagnóstico del acné usando biomarcadores de lesiones y método de cribado in vitro para identificar sus moduladores**

30 Prioridad:

05.01.2006 US 756212 P

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

09.07.2014

73 Titular/es:

**GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT
(100.0%)**

**Les Templiers 2400 Route des Colles
06410 Biot, FR**

72 Inventor/es:

THIBOUTOT, DIANE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 474 694 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

5 La presente invención se refiere a la identificación de modelos de biomarcadores/productos de expresión génica de lesiones del acné y en particular biomarcadores de lesiones del acné inflamatorio y sus usos en el método de diagnóstico del acné, y a métodos de cribado para identificar sus moduladores y al método de determinación *in vitro* de la sensibilidad de pacientes para desarrollar lesiones de acné.

El acné es la enfermedad cutánea más común que afecta a millones de personas en todo el mundo. Los pacientes con acné grave se enfrentan con frecuencia a problemas psicológicos y emocionales significativos debido a las cicatrices asociadas con la enfermedad. La patogenia del acné común es compleja y no del todo comprendida.

10 La patogenia del acné se ha relacionado con múltiples factores, tales como aumento de la producción de sebo, inflamación, hiperqueratinización folicular y la acción de *Propionibacterium acnes* dentro del folículo.

La inflamación es un componente clave de la patogenia del acné. Una reacción inmunológica al microbio gram-positivo *P. acnes* puede desempeñar un papel importante en la iniciación de la reacción inflamatoria (De Young *et al.*, 1984; Jappe *et al.*, 2002). Estudios recientemente publicados implican también en el acné inflamatorio al receptor de tipo Toll 2 (TLR-2, por la expresión inglesa Toll Like receptor 2).

15 El *Propionibacterium acnes* desencadena la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en las células inflamatorias por medio de la activación de TLR-2, que a su vez inicia una cascada de señalización intracelular que da como resultado la transcripción de genes, tales como la interleuquina-12 y la interleuquina-8 (Kim *et al.*, 2002). Además, el *P. acnes* viable y los microorganismos no muertos por calor, pueden estimular la liberación de citoquinas, tales como la IL-1 β , la fracción estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y la IL-8 (Nagy *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005).

25 Aunque el evento exacto de iniciación que provoca el acné sigue siendo un misterio, existe el debate sobre si la hiperqueratinización del conducto folicular precede a la afluencia de células inflamatorias o viceversa. Estudios recientes apoyan esta última hipótesis demostrando que se produce un aumento de la actividad de la IL-1 antes de la hiperproliferación alrededor de los folículos no implicados y esto desencadena el "ciclo de activación de los queratinocitos". (Freedberg *et al.*, 2001; Jeremy *et al.*, 2003)

30 Informes recientes demuestran que la piel expresa diversos péptidos antimicrobianos en respuesta a la proliferación de patógenos como parte de la inmunidad innata cutánea (Braff *et al.*, 2005; Schroder, 2004; Selsted and Ouellette, 2005). Entre este grupo de agentes antimicrobianos están incluidos principalmente miembros de la familia α -defensinas humanas y péptidos derivados de la granulisina (Deng *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 2004; McInturff *et al.*, 2005). Las β -defensinas 1 y 2 humanas (HBD-1 y HBD-2) se expresan en la unidad pilosebácea y su expresión está sobre-regulada en las lesiones de acné (Chronnell *et al.*, 2001). Estudios recientes también han descubierto que cepas seleccionadas de *P. acnes* pueden activar la HBD-2 a través de los TLR, lo que confirma aún más la importancia de estos péptidos en el acné inflamatorio (Nagy *et al.*, 2005).

35 El documento US2003211105 describe un método para identificar compuestos que inhiben el crecimiento tumoral y/o la metástasis en un sujeto y un método para tratar cáncer usando el receptor de MCP1 o MCP2.

El documento de Gao *et al.*, 2003, Chem. Rev., 103, 3733-3752, 10 de septiembre de 2009, describe un estudio sobre la química de los receptores de quimioquinas y sus ligandos, y un método para identificarlos.

40 El documento WO02/43758 describe un método de cribado de compuestos candidatos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias cutáneas, tales como el lupus eritematoso o la dermatitis atópica, y que comprende la determinación de la capacidad de un compuesto para modular la expresión de las quimioquinas.

El documento de Jugeau *et al.*, 2005, Brit. J. Derm., 153(6), 1105-1113, describe el aumento de la expresión de TLR-2 y TLR-4 en las lesiones de acné y establece un vínculo entre varios receptores de tipo Toll y el acné.

45 La investigación sobre el acné durante los últimos 25 años ha aumentado considerablemente nuestra comprensión sobre los factores etiológicos que dan lugar al acné. Sin embargo, con la aparición del perfil de expresión génica en biochip, han surgido nuevas oportunidades para volver a examinar la enfermedad e identificar potencialmente nuevas dianas para su tratamiento.

50 Por lo tanto, es necesario identificar los genes específicos expresados en las lesiones del acné inflamatorio en comparación con la piel normal de pacientes con acné y probar la hipótesis de que existen diferencias en la expresión génica entre la piel normal de pacientes con acné y la piel de sujetos sin acné que puede explicar la predisposición a la enfermedad y cuando aparece el acné establecer nuevas terapias capaces de modular/regular la expresión génica.

En un intento de comprender los genes específicos implicados en el acné inflamatorio, los autores de la presente invención han realizado perfiles de expresión génica en pacientes con acné. Las biopsias de piel se obtuvieron de una pápula inflamatoria y de piel normal de 6 pacientes con acné. Las biopsias también se tomaron de piel normal

de 6 sujetos sin acné. El perfil de expresión génica en biochip se realizó utilizando chips Affymetrix U133A, comparando piel con lesiones y sin lesiones en pacientes con acné y comparando piel sin lesiones de pacientes con acné con la piel de sujetos normales. Dentro de los pacientes con acné estaban sobre-regulados 211 genes en piel con lesiones en comparación con piel sin lesiones. Una proporción significativa de estos genes está implicada en las vías que regulan la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular e incluyen las metaloproteinasas de matriz 1 y 3, la interleuquina 8, la β -defensina 4 humana y la granzima B. Estos datos indican un papel destacado en las lesiones de acné de las metaloproteinasas de matriz, las citoquinas inflamatorias y los péptidos antimicrobianos. Estos estudios son los primeros en describir los cambios globales de la expresión génica en las lesiones del acné inflamatorio y como tal pueden ser de utilidad en la identificación de potenciales dianas terapéuticas en el acné inflamatorio.

Por lo tanto, se propone tener como dianas los genes antes mencionados y/o los productos de expresión de los genes para prevenir y/o tratar el acné, así como los trastornos asociados al acné (por ejemplo, la hiperseborrea).

Por acné se entiende todas las formas de acné, especialmente acné simple, acné comedoniano, acné papulopustuloso, acné papulocomedoniano, acné noduloquístico, acné conglobata, acné queloides de la nuca, acné miliar recurrente, acné necrótico, acné neonatal, acné ocupacional, rosácea, acné senil, acné solar y acné relacionado con la medicación.

En el contexto de la presente invención, "gen" se refiere a un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que codifica una expresión de proteína/biomarcador. Dicho gen se considera también como un gen "diana" para el que se busca un modulador.

Cuando la diana es preferiblemente un gen humano o su producto de expresión, la invención podría utilizar células que expresen el gen o la proteína/biomarcador asociado por incorporación genómica o por una proteína que codifica la expresión génica transitoria.

Referencias de secuencias humanas correspondientes se recogen en las Tablas 1 y 2.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a biomarcadores y/o productos de expresión génica de lesiones de acné como biomarcadores de lesiones de acné seleccionados de la siguiente lista:

Metaloproteinasa de la matriz 1 (MMP1); metaloproteinasa de la matriz 3 (MMP3); interleuquina 8 (IL8); beta defensina 4 (DEFB4); inhibidor 3 de proteasas derivadas de la piel (SKALP) (PI3); ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C) (CXCL2); enzima editora del mRNA de la apolipoproteína B (APOBEC3A); superóxido-dismutasa 2 (SOD2) mitocondrial; granzima B (GZMB); proteína de unión al calcio S100A9 (calgranulina B) (S100A9); receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); heparanasa (HPSE); proteína amiloide sérica A2 (SAA2); receptor de leucotrieno B4 (LTB4R); miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF1B); receptor 1 del componente 3a del complemento (C3AR1); receptor 65 acoplado a la proteína G (GPR65); proteína 1 que contiene una repetición IAP baculoviral (BIRC1); antígeno CD14 (CD14); quinasa regulada por suero/glucocorticoides (SGK); antígeno CD28 (Tp44) (CD28); inhibidor de la activación de caspasas en la apoptosis (AVEN); factor 3 asociado a los receptores de TNF (TRAF3); familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro B10 (AKR1B10); fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial) (PLA2G2A); familia de las UDP glicosiltransferasas 1, polipéptido A10 (UGT1A10); escramblasa fosfolipídica 1 (PLSCR1); proteína amiloide sérica A2 (SAA2); proteína 5 de unión a ácidos grasos (asociada a la psoriasis) (FABP5); araquidonato-5-lipooxigenasa (ALOX5); fosfoinositol-3-quinasa polipéptido catalítico delta (PIK3CD); secretoglobina, familia 1D, miembro 2 (SCGB1D2); secretoglobina, familia 2A, miembro 1 (SCGB2A1); miembro 3 de la superfamilia transmembranal 4 (TM4SF3); homólogo 5 de mutS (E. coli) (MSH5); secretoglobina, familia 2A, miembro 2 (SCGB2A2); homólogo 5 de mutS (E. coli) (MSH5); proteína relacionada con el rizado (FRZB); proteína hipotética MGC11242 (MGC11242); SRY (región Y determinante del sexo)-caja 10 (SOX10); queratina 18 (KRT18); lipasa hepática (LIPC); factor de coagulación X (F10); proteína hipotética FLJ20280 (FLJ20280); troponina C2 rápida (TNNC2); receptor 3 de la retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL (KDEL3); KIAA0514; proteína DKFZP564O243; subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo D, miembro 1 (NR1D1); antígeno CD47 (antígeno relacionado con el Rh, transductor de señales asociado a integrinas) (CD47); antígeno de la superficie celular Thy1 (Thy1); ligando de selectina P (SELP); inhibidor 1 de metalopeptidasas TIMP (TIMP1); ligando 21 de quimioquinas (resto C-C) (CCL21); proteína de unión al calcio S100A9 (calgranulina B) (S100A9); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5); selectina L (molécula 1 de adhesión a linfocitos) (SELL).

En particular, estos biomarcadores son biomarcadores de lesiones del acné inflamatorio.

En el contexto de la invención, se entiende como biomarcador una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (definición del NIH).

Por lo tanto, los biomarcadores se utilizan para indicar o medir un proceso biológico (por ejemplo, niveles de una proteína específica en sangre o fluidos, mutaciones genéticas o anomalías observadas en ensayos). La detección de

biomarcadores específicos de una enfermedad puede ayudar en la identificación, diagnóstico y tratamiento de los individuos afectados y de las personas que pueden estar en riesgo pero que aún no presentan síntomas.

Además, la presente invención se refiere a dichos productos de expresión génica como "dianas biológicas". Por diana se entiende una enzima, un receptor, otra proteína o mRNA que puede ser modificado por un estímulo externo. La definición depende del contexto y se puede referir a la diana biológica de un compuesto farmacológicamente activo o a la diana receptora de una hormona. El resultado es que una molécula es "golpeada" por una señal/estímulo y por ello cambia su comportamiento.

En el contexto de la invención, las dianas de interés son las recogidas en las Tablas 1 y 2 y en la Figura 1 y, más específicamente, los productos de expresión antes mencionados.

10 **Métodos de diagnóstico**

Una realización de la presente invención abarca un método de diagnóstico del acné o un método de seguimiento de la evolución de una enfermedad de acné o de la hiperseborrea usando la expresión de genes o biomarcadores/productos de expresión génica seleccionados de la siguiente lista: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5), comprendiendo dicho método la etapa de comparar la expresión de dichos genes o la actividad de los productos de expresión génica, en una muestra biológica de un paciente con una muestra biológica de un sujeto "de control".

Los productos de expresión génica/biomarcadores (por ejemplo, proteínas) podrían ser determinados por cualesquiera métodos apropiados, tales como transferencia de Western, IHC, análisis por espectrometría de masas (análisis MALDI-TOF y LC/MS), radioinmunoensayo (RIA), ELISA o por cualesquiera otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica o por dosificación de mRNA por cualesquiera métodos apropiados bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se entiende por sujeto "de control", un sujeto en estado sano o con una piel no afectada por acné.

En el contexto de un método de seguimiento de la evolución de una enfermedad de acné o de trastornos asociados al acné, se entiende por sujeto "de control" el mismo sujeto del que se tomó la muestra biológica en un momento diferente y preferiblemente al comienzo del tratamiento o antes del tratamiento (línea base). La comparación de los niveles de expresión génica o biomarcadores/productos de expresión génica, representa una herramienta para determinar la eficacia del producto y decidir si se continua o no el tratamiento con el mismo producto.

Otra realización de la invención es un método de determinación *in vitro* de la sensibilidad de un paciente a desarrollar lesiones de acné y/o hiperseborrea, que comprende la etapa de comparar los niveles de expresión génica o de productos de expresión génica, o la actividad de los biomarcadores seleccionados de la lista siguiente: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5), en una muestra biológica de un paciente con una muestra biológica de un sujeto "de control".

De nuevo, los niveles de biomarcadores y/o de productos de expresión génica podrían medirse por cualesquiera métodos apropiados, tales como transferencia de Western, IHC, análisis por espectrometría de masa (análisis MALDI-TOF y LC/MS), radioinmunoensayo (RIA), ELISA o por cualesquiera otros métodos bien conocido por los expertos en la técnica y, por ejemplo, por dosificación por ELISA o por dosificación de mRNA por cualesquiera métodos apropiados bien conocidos por los expertos en la técnica.

En este caso, el paciente es asintomático y presenta síntomas visibles de acné. Por tanto, el sujeto "de control" es de una población de referencia sana.

En el contexto de los métodos de diagnóstico antes mencionados, la muestra biológica podría ser cualquier muestra de fluido biológico (sebo, sangre, orina, plasma....) o cualquier muestra extraída por biopsia y preferiblemente una muestra de piel.

45 **Métodos de cribado**

Otra realización de la presente invención es un método de cribado *in vitro* de fármacos candidatos (o compuesto principal de una familia) susceptibles de prevenir y/o tratar el acné así como los trastornos asociados al acné (por ejemplo, la hiperseborrea) que comprende determinar la capacidad de dicho candidato para inhibir o sub-regular la expresión de un gen seleccionado o la actividad de dicho producto de expresión génica seleccionado escogido de la siguiente lista: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5). Dicho método comprende la etapa de determinar la capacidad del fármaco candidato para modular (por ejemplo, sub-regular o sobre-regular) dicha expresión génica y/o dichos niveles de biomarcadores/productos de expresión génica mencionados en la Tabla 3 y/o sus actividades.

En una realización específica, la invención es un método de cribado *in vitro* de fármacos candidatos susceptibles de

prevenir y/o tratar el acné, así como los trastornos asociados al acné (por ejemplo, la hiperseborrea); comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- a. recoger al menos dos muestras biológicas: una que representa un estado patológico de lesión de acné y la otra que representa un estado sano;
- 5 b. poner en contacto al menos una muestra o una mezcla de muestras con uno o más fármacos candidatos que se han de analizar;
- c. medir la expresión génica o el nivel o la actividad del producto de expresión génica en las muestras biológicas o en las mezclas obtenidas en b); seleccionándose dicho producto de expresión génica de la siguiente lista: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5);
- 10 d. seleccionar fármacos candidatos que sean capaces de modular la expresión génica o el nivel o la actividad del producto de expresión génica medido en dichas muestras o mezclas obtenidas en b) y comparar los niveles con una muestra no mezclada con el fármaco candidato.

15 Por "modular" se entiende cualquier efecto sobre la expresión o actividad de biomarcadores/productos de expresión génica, cualquier efecto sobre los genes o sobre la actividad de al menos uno de su(s) promotor(es) de expresión y preferiblemente cualquier efecto que induzca total o parcialmente, por ejemplo, una sub-regulación o una sobre-regulación, una estimulación o una inhibición.

20 En el contexto de la presente invención y sin notificación particular, se entiende que "expresión de biomarcadores/producto de expresión génica" se refiere a una cantidad de una proteína o cualquier otro producto resultante de la transcripción y/o traducción de un gen. Por actividad se entiende la actividad biológica.

Por "actividad de promotor(es) de genes" se entiende la capacidad del (de los) promotor(es) para desencadenar la transcripción de secuencias de DNA bajo el control de dicho(s) promotor(es).

En una realización particular, en el método de cribado los productos de expresión génica en la etapa c) se seleccionan de la siguiente lista o de los recogidos en la Tabla 4:

25 Beta defensina 4 (DEFB4); inhibidor 3 de proteasas derivadas de la piel (SKALP) (PI3); ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C) (CXCL2); enzima editora del mRNA de la apolipoproteína B (APOBEC3A); superóxido-dismutasa 2 (SOD2) mitocondrial; granzima B (GZMB); ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C) (CXCL2); receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor de leucotrieno B4 (LTB4R); miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF1B); receptor 1 del componente 3a del complemento (C3AR1); receptor 65 acoplado a la proteína G (GPR65); proteína 1 que contiene una repetición IAP baculoviral (BIRC1); quinasa regulada por suero/glucocorticoides (SGK); antígeno CD28 (CD28); inhibidor de la activación de caspasas en la apoptosis (AVEN); factor 3 asociado a los receptores de TNF (TRAF3); familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro B10 (AKR1B10); fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial) (PLA2G2A); familia de las UDP glicosiltransferasas 1, polipéptido A10 (UGT1A10); escramblasa fosfolipídica 1 (PLSCR1); proteína amiloide sérica A2 (SAA2); proteína 5 de unión a ácidos grasos (asociada a la psoriasis) (FABP5); fosfoinositol-3-quinasa polipéptido catalítico delta (PIK3CD); secretoglobina, familia 1D, miembro 2 (SCGB1D2); secretoglobina, familia 2A, miembro 1 (SCGB2A1); miembro 3 de la superfamilia transmembranal 4 (TM4SF3); homólogo 5 de mutS (E. coli) (MSH5); secretoglobina, familia 2A, miembro 2 (SCGB2A2); proteína relacionada con el rizado (FRZB); SRY (región Y determinante del sexo)-caja 10 (SOX10); queratina 18 (KRT18); lipasa hepática (LIPC); factor de coagulación X (F10); troponina C2 rápida (TNNC2); receptor 3 de la retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL (KDELR3); subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo D, miembro 1 (NR1D1); antígeno CD47 (antígeno relacionado con el Rh, transductor de señales asociado a integrinas) (CD47); antígeno de la superficie celular Thy1 (Thy1); ligando de selectina P (SELPG); inhibidor 1 de metalopeptidasas TIMP (TIMP1); ligando 21 de quimioquinas (resto C-C) (CCL21); proteína de unión al calcio S100A9 (calgranulina B) (S100A9); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5); selectina L (molécula 1 de adhesión a linfocitos) (SELL).

Los compuestos de ensayo son cualquier tipo de compuestos, procedentes de una fuente natural o sintética. Los compuestos sintéticos podrían ser sintetizados químicamente o proceder de un banco de datos de compuestos químicos, con una estructura definida o no caracterizada, o presentes en una mezcla de compuestos.

50 Están disponibles varios ensayos técnicos para evaluar la actividad de compuestos que modulen los biomarcadores/productos de expresión génica antes mencionados.

De acuerdo con una primera realización, las muestras biológicas son células transfectadas que contienen operativamente un gen indicador bajo el control de un promotor que controla (total o parcialmente) la expresión de un gen antes mencionado. Por lo tanto la etapa c) anterior consiste en medir la expresión del gen indicador.

55 El gen indicador puede codificar una enzima que, con su sustrato correspondiente, proporciona producto(s) coloreado(s), tales como CAT (cloranfenicol acetiltransferasa), GAL (beta galactosidasa) o GUS (beta glucuronidasa). Podría ser gen de luciferasa o de GFP (proteína verde fluorescente).

La cantidad de la proteína del gen indicador o su actividad se determina típicamente por métodos colorimétricos, fluorométricos o de quimioluminiscencia.

De acuerdo con una segunda realización de la invención, las muestras biológicas son células que expresan el gen de interés y la etapa c) anterior consiste en medir la actividad del producto génico.

- 5 Cualquier tipo de célula es adecuado para la invención. Las células pueden expresar endógenamente dicho gen como sebocito. Los órganos adecuados para la presente invención pueden ser de origen animal o humano como glándula prepuccial o glándula sebácea.

Podrían ser adecuadas las células transformadas por ácido nucleico heterólogo que codifica el producto de expresión génica de interés. Preferiblemente, dicho ácido nucleico es de origen animal (preferiblemente mamífero) o humano. Una gran variedad de células hospedantes es adecuada para la invención y en particular células Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Las células son transfectadas transitoria o permanentemente por un ácido nucleico de interés por un método bien conocido por los expertos en la técnica, como por ejemplo precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, liposomas, virus, electroporación o microinyección.

10 En los métodos descritos anteriormente, los niveles de expresión de un gen de interés o un gen indicador se determinan de acuerdo con las tasas de transcripción o traducción.

Por tasa de transcripción se entiende los niveles de mRNA. Por traducción se entiende la tasa de producción de proteínas.

Los métodos cuantitativos o semi-cuantitativos para la detección del mRNA del gen de interés son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 Los métodos basados en la hibridación de mRNA con sondas nucleicas son conocidos típicamente (transferencia de Northern, RT-PCR, protección de RNasa). Podría ser ventajoso usar marcadores de detección, tales como agentes fluorescentes, radio-marcadores, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

La tasa de traducción de un gen puede ser también determinada por ensayos inmunológicos del producto de expresión génica. Para este objetivo, se pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales. Los métodos de preparación de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal podría producirse de acuerdo con el método de Köhler and Milstein (Nature (London), 256: 495-497 (1975)) o por clonación de un clon de expresión de ácidos nucleicos en hibridoma.

Las dosificaciones inmunológicas se determinan en fase sólida u homogénea, en uno o dos periodos de tiempo; con el llamado método sándwich o con el método de competencia.

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el anticuerpo es capturado sobre o por un soporte sólido, tales como microplacas, placas de poliestireno o bolas o bolas paramagnéticas. Para detectar el complejo anticuerpo/antígeno pueden servir la dosificación por ELISA, los radioinmunoensayos u otro tipo de métodos de detección.

Moduladores

35 El término "inhibe" se refiere a un compuesto que reduce o disminuye, restringe, sub-regula, previene (total o parcialmente) o suprime, antagoniza, detiene, bloquea la actividad de biomarcadores/productos de expresión génica. Por parcialmente, se entiende una reducción de la actividad de al menos 25%, preferiblemente de al menos 35%, más preferiblemente de al menos 50% y preferiblemente de al menos entre 70% y 90%.

40 Particularmente, el modulador podría interactuar y bloquear el sitio activo del producto de expresión génica como inhibidor competitivo.

Un inhibidor preferido es activo en una solución a una concentración de al menos inferior a 1 μ M, preferiblemente inferior a 0,1 μ M, preferiblemente menor que 0,01 μ M.

45 El modulador podría ser un anticuerpo y preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Ventajosamente, el anticuerpo monoclonal se administra a un paciente en una cantidad suficiente para que la concentración plasmática sea de aproximadamente 0,01 μ g/mL a aproximadamente 100 μ g/mL, preferiblemente desde aproximadamente 1 μ g/mL hasta aproximadamente 5 μ g/mL.

El modulador podría ser bien un polipéptido, un DNA o RNA antisentido, un si-RNA o un PNA ("ácido nucleico peptídico", es decir, con una cadena polipeptídica sustituida con las bases purínicas y pirimidínicas y que tiene una estructura similar al DNA para hibridación con este último)

50 En el método de cribado *in vitro* de fármacos candidatos, los fármacos candidatos o los compuestos moduladores seleccionados se formulan en una composición, asociados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se administran por vía oral, enteral, parenteral o tópica. Preferiblemente, la vía de administración es

tópica.

Por vía oral, la composición podría estar en forma de comprimidos, píldoras, grageas, jarabe, suspensión, solución, polvo, gránulos, emulsión, suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas compatibles con una liberación controlada.

5 Por vía parenteral, la composición podría estar en forma de solución o suspensión para inyección o perfusión.

Por vía tópica, la composición es particularmente útil para el tratamiento de piel y mucosa y podría estar en forma de ungüentos, cremas, leches, pomadas, polvos, tampones bebibles, soluciones, geles, gel-crema, pulverizaciones, loción, emulsiones, suspensiones o suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas compatibles con una liberación controlada. La composición podría estar en forma anhidra o acuosa o ser una emulsión. En una realización preferida, la composición está en forma de gel, crema o loción. La composición comprende de 0,001 a 10%, preferiblemente de 0,01 a 5% en peso/peso total de la composición del compuesto modulador.

La composición puede comprender también aditivos inertes o sus mezcla, tales como:

- agentes humectantes;
- 15 - agentes mejoradores del sabor;
- agentes conservantes, tales como ésteres de ácido parahidroxibenzoico;
- agentes estabilizantes;
- agentes reguladores de la humedad;
- agentes reguladores del pH;
- 20 - agentes moduladores de la presión osmótica;
- agentes emulsionantes;
- filtros de UV-A y UV-B; y
- agentes antioxidantes, tales como alfa-tocoferol, butilhidroxianisol o butilhidroxitolueno, superóxido dismutasa, ubiquinol o agente quelante de metales.

25 La presente invención será ilustrada a continuación por medio de los siguientes ejemplos y figuras:

Leyendas de la Tabla 3 y de las figuras de los dibujos

Tabla 3 - Expresión mejorada de los genes implicados en la inflamación y remodelación de la matriz en lesiones de acné

30 Para validar los hallazgos de los micro-biochips los inventores cuantificaron los niveles de mRNA de 5 genes implicados en la inflamación usando PCR cuantitativa en tiempo real. La Tabla 3 describe los cambios múltiples en la expresión de mRNA para MMP-1, MMP-3, IL-8, HBD-4 y granzima B, respectivamente, en lesiones de acné inflamatorio y biopsias de piel normal del mismo grupo de pacientes. Los valores mostrados son valores medios estando indicados los errores estándares.

Figura 1 - Agrupación jerárquica de los genes implicados en la inflamación

35 Agrupación jerárquica de los genes implicados en la inflamación de 6 pacientes con biopsias de piel tomadas en el sitio de la lesión de acné (AL) y en un sitio correspondiente de piel normal (NS) del mismo paciente. Cada fila representa un gen marcado con el nombre del gen o número de acceso y cada columna representa la muestra del paciente. El color en cada celda refleja el nivel de expresión del gen correspondiente en la muestra correspondiente, con relación a su nivel medio de expresión en todo el conjunto de muestras de biopsias. Los niveles de expresión mayores que la media están sombreados en rojo y los menores que la media están sombreados en azul.

Figura 2 - Confirmación de los cambios en el modelo de expresión génica por inmunohistoquímica

Se realizó la tinción inmunohistoquímica de cortes de piel con acné y se compararon con los de piel clínicamente normal.

Figura 3 - Tinción inmunohistoquímica de MMP-1 en piel clínicamente normal y con acné inflamatorio.

45 La MMP-1 se expresó en la epidermis y las glándulas sebáceas en el acné inflamatorio como se muestra en (b) en comparación con la IgG1 de control como se muestra en (a). Se pueden observar niveles variables de la tinción de MMP-1 en una serie de cortes de piel clínicamente normal del mismo paciente con acné (c-e). Se observa un mayor nivel de expresión de la tinción de MMP-1 en la epidermis en cortes próximos a la inflamación perifolicular microscópicamente visible (c) y se observan niveles progresivamente menores de la tinción de MMP-1 en sitios distales de ella (d, e).

Ejemplo 1: La expresión de mediadores inflamatorios, péptidos antimicrobianos y metaloproteinasas de la matriz está aumentada en lesiones de acné en comparación con piel no implicada

Materiales

5 Los chips con genes 'HG-U133A 2.0' fueron adquiridos a Affymetrix (Santa Clara, California). Los cebadores para MMP-1, MMP-3, IL-8, B-defensina humana (HBD-4) y granzima B para PCR en tiempo real se obtuvieron de Applied Biosystems (California). Los anticuerpos primarios para inmunohistoquímica para MMP-1 e IL-8 se compraron a R&D Systems (Minneapolis, MN) y para HBD-4 a Abcam Inc. (Cambridge, MA)

Selección de pacientes y biopsia de tejidos

10 En el estudio fueron enrolados 12 pacientes, incluyendo varones y hembras de 18 a 45 años, 6 pacientes con lesiones de acné en la espalda y 6 sujetos sin acné. Los criterios de inclusión para el grupo de lesiones de acné incluían: a) varones y hembras de 18 a 45 años con acné inflamatorio en sus espaldas; b) sujetos sin otra enfermedad de la piel en la zona de la biopsia; c) sujetos que estaban dispuestos a que se le realizaran biopsias de piel de su espalda; y d) sujetos que no habían sido tratados con isotretinoína para el acné en los 6 meses anteriores.

15 Los criterios de inclusión para sujetos sin acné incluían: a) varones y hembras de 18 a 45 años que estaban dispuestos a que se le realizara una biopsia de piel de sus espaldas; y b) sujetos sin otra enfermedad de la piel en las zonas de biopsia. Los criterios de exclusión (en todos los sujetos) incluían: sujetos que estaban tomando medicamentos por vía oral que podrían influir en la expresión génica en la piel o que se les estaba aplicando medicamentos por vía tópica en las zonas diana de la espalda. Se realizó una biopsia por punción (5 mm) de la piel en 2 sitios en la espalda de los pacientes con acné, una en el sitio de la pápula de acné inflamatorio y otra en una región de la piel clínicamente normal. Los sujetos normales sin acné fueron sometidos a una sola biopsia tomada de la piel normal en la espalda.

Extracción de RNA, marcaje e hibridación para sondar biochips

25 Se congelaron súbitamente y se criocortaron individualmente muestras de piel para facilitar el aislamiento del RNA. Se aisló el RNA total de la piel y se trató con DNasa utilizando el kit *RNeasy Fibrous Tissue Kit* (Qiagen Inc, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA se precipitó con etanol para concentrar la muestra y luego se cuantificó usando un espectrofotómetro. Aproximadamente 2 µg del RNA total de cada muestra se utilizó para generar cDNA de doble cadena usando un cebador T7-oligo (dT). El cRNA biotinilado producido por transcripción *in vitro*, se fragmentó y se hibridó a una microbiochip U133A 2.0 humano de Affymetrix. Las biochips fueron procesados en una *GeneChip Fluidics Station 450* y escaneados en un *Affymetrix GeneChip Scanner*.

PCR cuantitativa en tiempo real.

30 Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real para confirmar los cambios en el nivel de los genes seleccionados de los datos del biochip. El DNA complementario se generó a partir de 1 µg de RNA total, cebado con oligo dT, usando el *Superscript First-Strand Synthesis System* para la RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usaron series de mezclas maestras y sondas cebadoras de *Assays-on-Demand Taqman Universal PCR* (Applied Biosystems) para realizar la PCR en tiempo real en el sistema de PCR en tiempo real rápido *7900HT* de *ABI* con módulo de bloques de placas de 384 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras correspondientes a 80 ng de entrada de RNA total se analizaron por triplicado para el gen de referencia TBP, así como para 6 genes de interés (MMP-1, MMP-3, DEFB4, IL8, GZMB, y GATA6). No se realizaron análisis de moldes ni controles a RT.

Inmunohistoquímica

40 Con el fin de verificar los cambios de la expresión génica a nivel de proteínas, se reclutó una cohorte de 4 sujetos adicionales con acné para someterlos a biopsias de una lesión de acné inflamatorio y de piel no implicada de la espalda. Además, se obtuvieron muestras de piel de otros sujetos sin acné para determinar aún más la expresión de las proteínas de interés. La inmunohistoquímica se realizó en estas muestras después de la fijación con formol, incrustación en parafina y procesamiento del tejido como se describió previamente (). Los cortes se incubaron con anticuerpo monoclonal para MMP-1 (1:200) y beta-defensina 4 (1:100) y anticuerpo policlonal para IL-8 (1:50) durante una noche a 4°C. Los anticuerpos primarios para MMP-1 y IL-8 fueron adquiridos a *R&D Systems*, mientras que el anticuerpo para HBD-4 se adquirió a *Abcam*. Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados contra los respectivos anticuerpos primarios a una dilución de 1:500 durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante 30 minutos con el reactivo ABC (*Vector Labs*). El kit AEC de *Vector Labs* se utilizó como cromógeno, que tiñe con un color rojo. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina y los portaobjetos se analizaron por microscopía.

Agrupamiento

55 De los 211 genes que estaban sobre-regulados en las lesiones de acné, 41 fueron identificados como parte del conjunto de sondas inflamatorias generado en el centro de análisis *NetAffix* desde la página web de Affymetrix (indíquese la dirección de la web). La agrupación jerárquica de las muestras de pacientes y de los genes implicados

en la inflamación se realizó utilizando el programa informático *dChip* (Li and Wong, 2003), versión 1.3. Las muestras de pacientes incluían biopsias de piel tomadas en el sitio de la lesión de acné (AL) y en un sitio de piel clínicamente normal (NS) del mismo paciente. Los datos de intensidad de los biochips normalizados se importaron en el programa informático *dChip*. El archivo de información genética para el biochip HG-U133A de genoma humano de Affymetrix fue obtenido de la página web de *dChip* en www.dChip.org.

Análisis estadístico

Antes de analizar cambios significativos en la expresión génica, las señales de expresión se normalizaron utilizando el paquete informático R-Affy de Bioconductor (versión 1.1, Irizarry et al. 2003a) para eliminar el ruido de fondo y las variaciones no biológicas entre biochips. El ruido de fondo se eliminó de las intensidades de las sondas PM utilizando el método "RMA" (Irizarry et al., 2003b), que adopta un modelo global para la distribución de las intensidades de la sonda y modela las intensidades de las sondas PM como la suma de un componente normal de ruido y un componente de señal exponencial. La normalización se realizó utilizando el método de normalización cuantil (Bolstad et al. 2003). La normalización cuantil supone que la expresión de la mayoría de los genes en los biochips no cambia en diferentes tratamientos y la distribución de intensidades de la sonda para cada biochip en el conjunto de datos es la misma. Para eliminar las sondas con valor atípico y compendiar las intensidades de sondas dentro de un conjunto de sondas en un solo valor de expresión, se aplicó el método "*Tukey biweight*" para las intensidades de las sondas PM normalizadas y con ruido de fondo ajustado. Se obtuvieron valores de expresión basados en las intensidades de las sondas PM no intensidades de las sondas PM-MM, debido a que se encontraron intensidades de las sondas PM y MM altamente correlacionadas lo que sugería que las intensidades de las sondas MM componían el ruido de fondo, así como las señales específicas de las sondas. Las alteraciones significativas de la expresión génica fueron identificadas usando el programa informático *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) (Tusher et al. 2001). SAM asigna una puntuación a cada gen sobre la base del cambio de la expresión génica con relación a la desviación típica de las mediciones repetidas e identifica los genes con cambios estadísticamente significativos en la expresión utilizando un procedimiento de permutación. SAM controla los positivos falsos resultantes de múltiples comparaciones mediante el control de la tasa de falso descubrimiento (FDR) (Benjamini and Hochberg, 1995). La FDR se define como la proporción de genes positivos falsos entre todos los genes que se consideran significativos.

Resultados

Se observó un modelo distinto de expresión génica en las lesiones inflamatorias de acné en comparación con la piel no implicada de los mismos pacientes. El análisis de los perfiles de expresión génica reveló que 211 genes estaban sobre-regulados en el sitio de la lesión de acné, mientras que 18 genes estaban sub-regulados (consúltense los datos suplementarios). Una mayoría de los genes cuya expresión está aumentada en las lesiones de acné estaban implicados en los procesos inflamatorios e incluían incluyen una variedad de quimioquinas, péptidos antimicrobianos, proteínas inductoras de apoptosis y colagenasas intersticiales (Véase la Tabla 1 y la Fig 1)

Los genes con los mayores aumentos de cambios múltiples en la expresión en las lesiones de acné incluían las metaloproteinasas de la matriz MMP-1 y MMP-3, que tenían modelos de expresión 92 y 64 veces mayores, respectivamente. Otros genes sobre-regulados significativamente incluían las citoquinas proinflamatorias IL-8 (52 veces), y CXCL-2 (16 veces). También se observaron aumentos significativos en la expresión del receptor 1 de quimioquinas (CCR1), receptor de IL-7, receptor de IL-13 y los miembros 5 y 9 de la familia IL-1. Estos datos ponen de relieve el papel prominente de estas citoquinas en el acné inflamatorio, que está de acuerdo con otros estudios que demuestran el papel de la IL-8 en la inducción del reclutamiento de mediadores quimiotácticos en el sitio de las lesiones de acné (Vowels *et al*, 1995).

La expresión de varios péptidos antimicrobianos también aumentó significativamente en las lesiones de acné en comparación con la piel normal de los mismos pacientes. Estos incluían HBD-4 y granulisina, que están sobre-regulados más de 33 veces y 2 veces, respectivamente. Los genes implicados en la apoptosis y las vías inmunológicas también estaban sobre-regulados significativamente en las lesiones de acné. Estos incluían granzima B que es responsable de la lisis de células diana en las respuestas inmunitarias mediadas por células y GPR65 que está implicado en la diferenciación de linfocitos T así como en su apoptosis. La granzima B estaba sobre-regulada más de 10 veces en las lesiones de acné en comparación con la piel normal, mientras que GPR65 estaba aumentado aproximadamente 2,7 veces. Las Tablas 1 y 2 proporcionan una lista más completa de los genes con cambios estadísticamente significativos en la expresión entre las lesiones del acné inflamatorio y la piel normal de los mismos pacientes.

Aunque muy pocos genes estaban sub-regulados en las lesiones de acné en comparación con la piel normal, se identificaron algunos genes importantes que regulan las vías claves (Tabla 2). Las proteínas relacionadas con el rizado que actúan como parte de la vía de señalización por "wnt" estaban sub-reguladas aproximadamente 2 veces. Se ha demostrado que la inhibición de la señalización por wnt en la piel influye en el destino de las células madre en favor del desarrollo de productos sebáceos en lugar de pelo (Merrill *et al.*, 2001). También estaban sub-regulados en la lesión del acné tres genes de la familia de las secretoglobinas: el miembro 2 de la familia 1D de las secretoglobinas y los miembros 1 y 2 de la familia 2A de las secretoglobinas. El miembro 2 de la familia 1D de las secretoglobinas y el miembro 1 de la familia 2A de las secretoglobinas están regulados transcripcionalmente por

esteroides y se unen a andrógenos y otros esteroides. La función del miembro 2 de la familia 2A de las secretoglobinas 2 no está clara.

5 Los perfiles de expresión génica de muestras de biopsia de piel normal de 6 sujetos sin acné se compararon con los perfiles obtenidos de piel normal (sitios no implicados) de 6 pacientes con acné. No se observaron cambios significativos en los modelos de expresión génica en este análisis (datos no mostrados). Se realizó un análisis de un subconjunto de genes diana y de nuevo no reveló diferencias significativas en la expresión génica entre la piel normal de los sujetos con y sin acné.

Ejemplo 2: Agrupación

10 Usando el programa informático *dChip* (Li and Wong, 2003) hemos realizado la agrupación jerárquica del conjunto completo de genes (229) que estaban significativamente sobre-regulados o sub-regulados a partir de nuestros datos de microbiochips y encontramos que las muestras de biopsias de acné inflamatorio implicaban lesiones de la piel agrupadas en un grupo separado de la piel clínicamente normal no implicada del mismo grupo de pacientes (consúltese los datos suplementarios). Usando el centro de análisis *NetAffix* en la página web de Affymetrix identificamos que 41 genes de un total de 211 genes sobre-regulados en el acné inflamatorio estaban implicados en la inflamación. La Figura 1 representa un diagrama de agrupación de los genes del acné inflamatorio y muestra el modelo de agrupación única de las muestras en 2 grupos, uno que corresponden a la piel implicada en la lesión de acné y otro correspondiente a la forma de piel clínicamente no implicada el mismo grupo de 6 pacientes.

Ejemplo 3: La qPCR confirma los datos de expresión en biochips de genes de los genes seleccionados

20 Seleccionamos 5 genes de interés basándonos en sus cambios múltiples y en la implicación en la inflamación de 5 sujetos con acné para validar los resultados de los microbiochips utilizando qPCR. Estos genes incluyen MMP-1, MMP-3, IL-8, β defensina 4 y granzima B. Los resultados de la qPCR se normalizaron para el gen de control interno, la proteína de unión a TATA (TBP). Se observó un gran aumento en la expresión del mRNA para los 5 genes analizados siendo la magnitud del cambio múltiple mayor que la observada con los microbiochips (Tabla 3XX. Por favor Nishit incluya también los cambios múltiples de los microbiochips en esta tabla).

25 Ejemplo 4: La inmunohistoquímica demuestra la localización en tejidos de las proteínas seleccionadas en las lesiones del acné inflamatorio y en piel normal.

30 Para confirmar aún más las diferencias en los modelos de expresión y de distribución en tejidos de la MMP-1 (colagenasa intersticial), IL-8 (citoquina pro-inflamatoria) y HBD-4 (un péptido antimicrobiano), realizamos la inmunohistoquímica en lesiones de acné inflamatorio, en piel no implicada de sujetos con acné y en piel normal de sujetos sin acné. Se observó un aumento de expresión de las 3 proteínas en las lesiones de acné inflamatorio en comparación con la piel normal de los sujetos con acné (Figura 2). La expresión de HBD-4 fue mayor en la epidermis de las lesiones de acné inflamatorio en comparación con la epidermis de la piel no implicada (Figura 3 A y C). Se observó inmunorreactividad con el anticuerpo para IL-8 en los sitios foliculares y perifoliculares de la inflamación en la lesión de acné (Figura 2B). La inmunorreactividad de IL-8 estaba relativamente ausente en la piel normal (Figura 35 2D).

Si bien hemos encontrado altos niveles de expresión de MMP-1 en la epidermis y las glándulas sebáceas en los cortes de biopsias de las lesiones de acné inflamatorio (Fig.3B), encontramos una variación significativa en la expresión de MMP-1 en biopsias de la piel no implicada del mismo paciente (Figura 3 C, D y E). Realizando cortes en serie de la piel clínicamente normal de un paciente con acné observamos inflamación perifolicular, lo que sugiere una lesión de acné temprana clínicamente no manifiesta. La inmunoreactividad de MMP-1 estaba aumentada en las zonas que estaban próximas a la inflamación perifolicular, mientras que se observó muy poca inmunorreactividad de MMP-1 en las zonas que tenían inflamación no microscópicamente visible. Los mayores niveles de expresión de MMP-1 en algunos sitios de la piel normal tienen que examinarse más a fondo para determinar si los cambios en la expresión de MMP-1 se encuentran entre los primeros cambios antes del desarrollo de comedones y acné inflamatorio en ese sitio.

Debate

El acné se ha reconocido como una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por aumento de la producción de sebo, diferenciación folicular anómala y colonización bacteriana. A pesar de los avances significativos que se han hecho en la última década para identificar los mecanismos patofisiológicos implicados en el acné, no hay estudios de microbiochips publicados que analicen el modelo diferencial de expresión génica en las lesiones del acné inflamatorio y en la piel normal. El nuestro es el primer estudio que proporciona una comparación completa. En este sentido, 211 genes estaban significativamente sobre-regulados en las lesiones del acné inflamatorio, muchos de los cuales, como era de esperar, están implicados en la inflamación. Los principales genes cuya expresión estaba aumentada han sido implicados en el acné. Estos incluyen metaloproteinasas de la matriz, β -defensina 4, IL-8 y granulinsina. Por el contrario, estaba sub-regulados un conjunto mucho más pequeño de genes (18), 3 de los cuales son de la familia de las secretoglobinas.

El reconocimiento de los patógenos microbianos por las células del sistema inmunitario desencadena mecanismos

de defensa del hospedante para combatir la infección. Estos incluyen péptidos antimicrobianos, citoquinas inflamatorias y enzimas pro-apoptóticas. Sin embargo, la activación de estos mismos mecanismos también da como resultado lesiones de tejidos y cicatrices, una característica observada comúnmente en el acné inflamatorio. Los datos generados en este estudio apoyan muchos de los recientes hallazgos relacionados con los mediadores inflamatorios en el acné. Por ejemplo, el grado en que *P. acnes* induce la expresión del péptido antimicrobiano β -defensina 2 (ahora conocido como β -defensina 4) e IL-8 (Nagy et al., 2005). Puesto que *P. acnes* está habitualmente presente en la piel de la mayoría de los individuos y se ha encontrado que no hay correlación entre el número de bacterias y la gravedad y el tipo de acné, es posible que variaciones entre cepas en la expresión de β -defensina 4 o IL-8 pueda desempeñar un papel en el desarrollo del acné inflamatorio. La β -defensina 4 es un miembro importante de la familia de las defensinas que son péptidos antimicrobianos y tiene una fuerte actividad antimicrobiana tanto contra bacterias gram-negativas como gram-positivas. Nuestros datos demuestran que la β -defensina 4 se expresa en la epidermis de las lesiones del acné inflamatorio, pero no en la piel normal y estos resultados están de acuerdo con otros estudios que demuestran un aumento en la expresión de las defensinas 1 y 2 en la epidermis de las lesiones del acné inflamatorio (Chronnell, et al., 2001).

La granulinsina es otro péptido antimicrobiano importante cuya expresión, en nuestro estudio, está aumentada de manera significativa en las lesiones del acné inflamatorio. En los últimos años la granulinsina ha ganado importancia como un péptido que puede realizar la doble función de ser un agente citotóxico contra las bacterias patógenas, así como un agente pro-inflamatorio que actúa como un quimioatrayente y activa los monocitos para producir citoquinas (Deng et al., 2005). Se han utilizado comúnmente antibióticos en el tratamiento del acné para combatir la *P. acnes* y otras bacterias y por lo tanto la sobre-regulación de estos péptidos antimicrobianos producidos por el cuerpo puede ser útil en matar las bacterias. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que mientras los niveles de algunas quimioquinas se han reducido como consecuencia del efecto microbicida del péptido granulinsina, los niveles de IL-8 permanecen inalterados (McInturff, et al., 2005).

La interleuquina-8, una quimioquina humana prototípica está descubierta desde 1990 como miembro fundador de la familia de las quimioquinas. La IL-8 es un importante mediador de la respuesta inflamatoria y una fuerte factor quimiotáctico para neutrófilos, basófilos y linfocitos T (Zachariae, 1993). Nuestro estudio demuestra que está marcadamente sobre-regulada en las lesiones del acné inflamatorio. La activación de esta quimioquina está regulada por una combinación de 3 mecanismos principales, a saber: a) la activación transcripcional por las vías de NF- κ B y la proteína quinasa JUN; b) la estabilización del mRNA por la vía p38 MAPK; y c) la desrepresión del promotor génico (Harant et al, 1996; Hoffmann et al, 2002; Mukaida et al, 1994). Al igual que en varias enfermedades inflamatorias, la IL-8 ha sido implicada en el desempeño de un papel importante en el montaje de una respuesta inflamatoria en las lesiones de acné. Varios estudios se han centrado en el papel de las bacterias para inducir IL-8 y han descubierto que este proceso puede ser mediado por la activación del factor de transcripción NF- κ B (Chen et al., 2002; Vowels, et al., 1995). Por tanto, una comprensión detallada de las vías que regulan la producción de IL-8 puede ayudarnos a identificar nuevas dianas y mejores terapias para el tratamiento del acné.

Los estudios más recientes realizados por Kang et al., se han centrado en identificar las diversas cascadas de señalización intracelular asociadas a factores de transcripción implicados en la inflamación y la degradación de la matriz en las lesiones de acné. La activación de la vía NF- κ B como pone de manifiesto la localización nuclear de p65 y p50, y la posterior regulación de las citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-8 han dado pistas que ayudan a nuestra comprensión de las vías moleculares que regulan la inflamación en el acné (Kang et al, 2005). Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios de Kang et al., en demostrar mayor expresión de metaloproteinasas de la matriz, como MMP-1 y MMP-3, y citoquinas especialmente IL-8 en la lesión del acné inflamatorio. Debido a que la expresión de MMP-1 se observó también en algunas zonas de piel clínicamente normal, que tenían zonas de inflamación microscópicamente visibles, adelantamos la hipótesis que la MMP-1 podía desempeñar un papel durante las etapas iniciales de la inflamación y que la inflamación puede ser uno de los episodios precedentes a las lesiones de acné clínicamente visibles como había sido sugerido previamente (Jeremy, et al., 2003).

Nuestro estudio nos ha llevado también a enfocar la fuerte sobre-regulación de la granzima B, un componente esencial de la vía apoptótica que es necesario para la lisis de las células diana en la respuesta inmunitaria mediada por células (Heibei et al., 2000). La granzima B se encuentra comúnmente en los gránulos producidos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales (NK). Las células CTL y NK utilizan gránulos que contienen perforina y granzima B para destruir las células infectadas con patógenos intracelulares (Trapani and Smyth, 2002). La granzima B puede inducir la muerte de las células diana por medio de dos vías complementarias, una vía citosólica que implica activación de la cascada de las caspasas y una vía nuclear en la que interviene la activación de CDC-2 (Talanian et al., 1997). Aunque se sabe muy poco del papel desempeñado por la granzima B en la patogénesis del acné, la fuerte sobre-regulación de la granzima B en lesiones de acné como se observa en nuestros estudios ayudará a fomentar el interés en un estudio más a fondo de esta proteasa en el acné.

Estos resultados ilustran muy firmemente el papel de las diversas proteínas implicadas en la inflamación y en la remodelación de la matriz en las lesiones del acné inflamatorio y proporcionan una visión más detallada de los diferentes modelos de expresión génica en un acné inflamatorio y en piel clínicamente normal del mismo grupo de pacientes. La sobre-regulación de péptidos antimicrobianos es de interés para apoyar además su papel en la respuesta inflamatoria endógena a los patógenos bacterianos y quizás también en proporcionar un fundamento para

5 su potencial uso terapéutico en el acné. Sin embargo, las preguntas fundamentales siguen siendo las relacionadas con la naturaleza de los episodios iniciadores en el desarrollo de lesiones de acné. Es probable que los perfiles de expresión génica en cualquier proceso inflamatorio en la piel sean bastante similares y que muchos de los cambios observados en las lesiones inflamatorias son probablemente secundarios a los episodios patógenos primarios todavía no identificados. El desafío que está pendiente es identificar estos episodios primarios en el acné, así como en otras enfermedades inflamatorias.

Tabla 1 - Lista de genes sobre-regulados en lesiones de acné cuando se comparan con piel normal

ID del conjunto de sondas	Nº de acceso	Cambio múltiplo	Nombre del gen	Símbolo del gen
Lista de genes sobre-regulados más de 10 veces en lesiones de acné				
204475_en	NM_002421	92,166	Metaloproteinasa de la matriz 1	MMP1
205828_en	NM_002422	64,020	Metaloproteinasa de la matriz 3	MMP3
202859_x_en	NM_000584	52,521	Interleuquina 8	IL8
207356_en	NM_004942	33,300	Beta defensina 4	DEFB4
203691_en	NM_002638	19,354	Inhibidor 3 de proteasas derivadas de la piel (SKALP)	PI3
41469_en	L10343	17,495	Inhibidor 3 de proteasas derivadas de la piel (SKALP)	PI3
204470_en	NM_001511	16,152	Ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C)	CXCL2
210873_x_en	U03891	15,921	Enzima editora del mRNA de la apolipoproteína B	APOBEC3A
216841_s_en	X15132	11,529	Superóxido-dismutasa 2, mitocondrial	SOD2
210164_en	J03189	10,630	Granzima B	GZMB
Sobre-regulación de genes implicados en la vía inflamatoria (en lesiones de acné)				
202859_x_en	NM_000584	52,521	Interleuquina 8	IL8
204470_en	NM_001511	16,152	Ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C)	CXCL2
203535_en	NM_002965	5,754	Proteína de unión al calcio S100A9 (calgranulina B)	S100A9
205098_en	AI421071	4,057	Receptor 1 de quimioquinas (resto C-C)	CCR1
205099_s_en	AI421071	3,126	Receptor 1 de quimioquinas (resto C-C)	CCR1
219403_s_en	AF155510	2,920	Heparanasa	HPSE
208607_s_en	NM_030754	2,659	Proteína amiloide sérica A2	SAA2
216388_s_en	U33448	2,308	Receptor de leucotrieno B4	LTB4R
203508_en	NM_001066	2,287	Miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral	TNFRSF1B
209906_en	U62027	2,238	Receptor 1 del componente 3a del complemento	C3AR1

ID del conjunto de sondas	Nº de acceso	Cambio múltiplo	Nombre del gen	Símbolo del gen
Sobre-regulación de genes implicados en la vía apoptótica (en lesiones de acné)				
210164_en	J03189	10,630	Granzima B	GZMB
214467_en	NM_003608	2,772	Receptor 65 acoplado a la proteína G	GPR65
204860_s_en	AI817801	2,272	Proteína 1 que contiene una repetición IAP baculoviral	BIRC1
201743_en	NM_000591	2,211	Antígeno CD14	CD14
201739_en	NM_005627	1,663	Quinasa regulada por suero/gluco corticoides	SGK
206545_en	NM_006139	1,658	Antígeno CD28 (Tp44)	CD28
219366_en	NM_020371	1,627	Inhibidor de la activación de caspasa en la apoptosis	AVEN
208315_x_en	NM_003300	1,393	Factor 3 asociado a los receptores de TNF	TRAF3
Sobre-regulación de genes implicados en la vía del metabolismo de lípidos y esteroides (en lesiones de acné)				
206561_s_en	NM_020299	8,389	Familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro B10	AKR1B10
203649_s_en	NM_000300	5,518	Fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial)	PLA2G2A
215125_s_en	AV691323	2,804	Familia de las UDP glicosiltransferasas 1, polipéptido A10	UGT1A10
202430_s_en	NM_021105	2,959	Escramblasa fosfolipídica 1	PLSCR1
208607_s_en	NM_030754	2,659	Proteína amiloide sérica A2	SAA2
202345_s_en	NM_001444	2,268	Proteína 5 de unión a ácidos grasos (asociada a la psoriasis)	FABP5
204446_s_en	NM_00698	2,128	Araquidonato-5-lipooxigenasa	ALOX5
203879_en	U86453	1,461	Fosfoinositol-3-quinasa polipéptido catalítico delta	PIK3CD

Tabla 2: Lista de genes sub-regulados en lesiones de acné comparados con piel normal

ID del conjunto de sondas	Nº de acceso	Cambio múltiplo	Nombre del gen	Símbolo del gen
Lista completa de genes que estaban sub-regulados en lesiones de acné				
206799_en	NM_006551	-2,889	Secretoglobina, familia 1D, miembro 2	SCGB1D2
205979_en	NM_002407	-2,883	Secretoglobina, familia 2A, miembro 1	SCGB2A1
203824_en	NM_004616	-2,677	Miembro 3 de la superfamilia transmembranal 4	TM4SF3
212913_en	BE674960	-2,586	Homólogo 5 de mutS (E. coli)	MSH5
206378_en	NM_002411	-2,227	Secretoglobina, familia 2A, miembro 2	SCGB2A2
221406_s_en	NM_025259	-1,991	Homólogo 5 de mutS (E. coli)	MSH5
203697_en	U91903	-1,939	Proteína relacionada con el rizado	FRZB
219127_en	NM_024320	-1,879	Proteína hipotética MGC11242	MGC11242
209842_at	AI367319	-1,766	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 10	SOX10
201596_x_en	NM_000224	-1,656	Queratina 18	KRT18
206606_en	NM_000236	-1,571	Lipasa, hepática	LIPC
205620_en	NM_000504	-1,547	Factor de coagulación X	F10
219717_en	NM_017741	-1,522	Proteína hipotética FLJ20280	FLJ20280
205388_en	NM_003279	-1,509	Troponina C2, rápida	TNNC2
207265_s_en	NM_016657	-1,442	Receptor 3 de la retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL	KDEL3
206747_en	NM_14696	-1,328	KIAA0514	KIAA0514
210006_en	BC002571	-1,325	Proteína DKFZP564O243	DKFZP564O243
31637_s_en	X72631	-1,310	Subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo D, miembro 1	NR1D1

Tabla 4: Lista de genes y biomarcadores/productos de expresión génica para cribado de moduladores

Acceso	Nombre del gen	Símbolo del gen
NM_004942	Beta defensina 4	DEFB4
NM_002638	Inhibidor 3 de proteasas derivadas de la piel (SKALP)	PI3
NM_001511	Ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C)	CXCL2
U03891	Enzima editora de mRNA de la apolipoproteína B	APOBEC3A
X15132	Superóxido-dismutasa 2, mitocondrial	SOD2
J03189	Granzima B	GZMB
NM_001511	Ligando 2 de quimioquinas (resto C-X-C)	CXCL2
AI421071	Receptor 1 de quimioquinas (resto C-C)	CCR1
U33448	Receptor de leucotrieno B4	LTB4R
NM_001066	Miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral	TNFRSF1B
U62027	Receptor 1 del componente 3a del complemento	C3AR1
NM_003608	Receptor 65 acoplado a la proteína G	GPR65
AI817801	Proteína 1 que contiene una repetición IAP baculoviral	BIRC1
NM_005627	Quinasa regulada por suero/glucocorticoides	SGK
NM_006139	Antígeno CD28 (Tp44)	CD28
NM_020371	Inhibidor de la activación de caspasa en la apoptosis	AVEN
NM_003300	Factor 3 asociado a los receptores de TNF	TRAF3
NM_020299	Familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro B10	AKR1B10
NM_000300	Fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial)	PLA2G2A
AV691323	Familia de las UDP glicosiltransferasas 1, polipéptido A10	UGT1A10
NM_021105	Escramblasa fosfolipídica 1	PLSCR1
NM_030754	Proteína amiloide sérica A2	SAA2
NM_001444	Proteína 5 de unión a ácidos grasos (asociada a la psoriasis)	FABP5
U86453	Fosfoinositol-3-quinasa polipéptido catalítico delta	PIK3CD
NM_006551	Secretoglobina, familia 1D, miembro 2	SCGB1D2
NM_002407	Secretoglobina, familia 2A, miembro 1	SCGB2A1
NM_004616	Miembro 3 de la superfamilia transmembranal 4	TM4SF3
BE674960	Homólogo 5 de mutS (E. coli)	MSH5
NM_002411	Secretoglobina, familia 2A, miembro 2	SCGB2A2
U91903	Proteína relacionada con el rizado	FRZB
AI367319	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 10	SOX10
NM_000224	Queratina 18	KRT18
NM_000236	Lipasa hepática	LIPC
NM_000504	Factor de coagulación X	F10
NM_003279	Troponina C2 rápida	TNNC2
NM_016657	Receptor 3 de la retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL	KDELR3
X72631	Subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo D, miembro 1	NR1D1
Z25521	Antígeno CD47 (antígeno relacionado con el Rh, transductor de señales asociado a integrinas)	CD47
NM_006288	Antígeno de la superficie celular Thy1	Thy1
NM003006	Ligando de selectina P	SELPG

ES 2 474 694 T3

NM_003254	Inhibidor 1 de metalopeptidasas TIMP	TIMP1
NM_002989	Ligando 21 de quimioquinas (resto C-C)	CCL21
NM_002965	Proteína de unión al calcio S100A9 (calgranulina B)	S100A9
NM_000647	Receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C)	CCR2
NM_000579	Receptor 5 de quimioquinas (resto C-C)	CCR5
NM_000655	Selectina L (molécula 1 de adhesión a linfocitos)	SELL

Referencias

- Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL: Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9-13, 2005.
- 5 Chen Q, Koga T, Uchi H, et al.: Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *J Dermatol Sci* 29: 97-103, 2002.
- Chronnell CM, Ghali LR, Ali RS, et al.: Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* 117: 1120-5, 2001.
- De Young LM, Young JM, Ballaron SJ, Spires DA, Puhvel SM: Intradermal injection of Propionibacterium acnes: a model of inflammation relevant to acne. *J Invest Dermatol* 83: 394-8, 1984.
- 10 Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 174: 5243-8, 2005.
- Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M: Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 116: 633-40, 2001.
- 15 Harant H, de Martin R, Andrew PJ, Foglar E, Dittrich C, Lindley IJ: Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 271: 26954-61, 1996.
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM: Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123: 522-9, 2004.
- 20 Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC: Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 192: 1391-402, 2000.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72: 847-55, 2002.
- 25 Jappe U, Ingham E, Henwood J, Holland KT: Propionibacterium acnes and inflammation in acne; P. acnes has T-cell mitogenic activity. *Br J Dermatol* 146: 202-9, 2002.
- Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ: Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol* 121: 20-7, 2003.
- Kang S, Cho S, Chung JH, Hammerberg C, Fisher GJ, Voorhees JJ: Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo. *Am J Pathol* 166: 1691-9, 2005.
- 30 Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, et al.: Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 169: 1535-41, 2002.
- McInturff JE, Wang SJ, Machleidt T, et al.: Granulysin-derived peptides demonstrate antimicrobial and anti-inflammatory effects against Propionibacterium acnes. *J Invest Dermatol* 125: 256-63, 2005.
- 35 Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E: Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15: 1688-705, 2001.
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K: Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56: 554-8, 1994.
- 40 Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L: Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124: 931-8, 2005.
- Schaller M, Loewenstein M, Borelli C, Jacob K, Vogeser M, Burgdorf WH, Plewig G: Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with Propionibacterium acnes and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 153: 66-71, 2005.
- 45 Schroder JM: [Epithelial antimicrobial peptides: local innate defense effector molecules]. *Ann Dermatol Venereol* 131: 411-6, 2004.
- Selsted ME, Ouellette AJ: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6: 551-7, 2005.

Talanian RV, Yang X, Turbov J, et al.: Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* 186: 1323-31, 1997.

Trapani JA, Smyth MJ: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735-47, 2002.

- 5 Vowels BR, Yang S, Leyden JJ: Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun* 63: 3158-65, 1995.

Zachariae CO: Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 181: 1-37, 1993.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico del acné o método de seguimiento de la evolución de una enfermedad de acné o de una hiperseborrea usando la expresión de genes o biomarcadores/productos de expresión génica seleccionados de la lista siguiente: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5), comprendiendo dicho método la etapa de comparar la expresión de dichos genes, o la actividad de los productos de expresión génica, en una muestra biológica de un paciente con una muestra biológica de un sujeto "de control".
2. Método de diagnóstico del acné de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el acné comprende acné simple, acné comedoniano, acné papulopustuloso, acné papulocomedoniano, acné noduloquístico, acné conglobata, acné queiloide de la nuca, acné miliar recurrente, acné necrótico, acné neonatal, acné ocupacional, rosácea, acné senil, acné solar y acné relacionado con la medicación.
3. Método de cribado *in vitro* de un fármaco candidato susceptible de prevenir y/o tratar el acné, así como la hiperseborrea, que comprende determinar la capacidad de dicho candidato para inhibir o sub-regular la expresión de un gen seleccionado o la actividad de dicho producto de expresión génica seleccionado elegido de la lista siguiente: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); y receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5).
4. Método de cribado *in vitro* de un fármaco candidato de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
- a) recoger al menos dos muestras biológicas: una que representa la lesión del acné y otra que representa el estado sano;
 - b) poner en contacto al menos una muestra o una mezcla de muestras con uno o más fármacos candidatos que se han de analizar;
 - c) medir la expresión génica o el nivel o la actividad del producto de expresión génica en las muestras biológicas o en las mezclas obtenidas en b); seleccionándose dicho producto de expresión génica de la lista siguiente: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); y receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5); y
 - d) seleccionar fármacos candidatos que sean capaces de modular la expresión génica o el nivel o la actividad del producto de expresión génica medido en dichas muestras o mezclas obtenidas en b) y comparar los niveles con una muestra no mezclada con el fármaco candidato.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los fármacos candidatos en la etapa d) son inhibidores de productos de expresión génica sobre-regulados que se seleccionan de la siguiente lista: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); y receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5).
6. Método de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que el acné comprende acné simple, acné comedoniano, acné papulopustuloso, acné papulocomedoniano, acné noduloquístico, acné conglobata, acné queiloide de la nuca, acné miliar recurrente, acné necrótico, acné neonatal, acné ocupacional, rosácea, acné senil, acné solar y acné relacionado con la medicación.
7. Método de determinación *in vitro* de la sensibilidad de un paciente para desarrollar lesiones de acné y/o una hiperseborrea, que comprende la etapa de comparar la expresión génica o los niveles de productos de expresión génica o la actividad de biomarcadores seleccionados de la lista siguiente: receptor 1 de quimioquinas (resto C-C) (CCR1); receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) /// receptor 2 de quimioquinas (resto C-C) (CCR2); y receptor 5 de quimioquinas (resto C-C) (CCR5) en una muestra biológica de un paciente con una muestra biológica de un sujeto "de control".
8. Método de determinación *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el acné comprende acné simple, acné comedoniano, acné papulopustuloso, acné papulocomedoniano, acné noduloquístico, acné conglobata, acné queiloide de la nuca, acné miliar recurrente, acné necrótico, acné neonatal, acné ocupacional, rosácea, acné senil, acné solar y acné relacionado con la medicación.

Tabla 3: Expresión aumentada de los genes implicados en la inflamación y en la remodelación de la matriz en lesiones de acné

	Cambio múltiplo en la expresión de mRNA en muestras de biopsias de una lesión de acné inflamatorio comparado con piel clínicamente normal	
	Valor medio	Error estándar
MMP-1	+170	± 18
MMP-3	+165	± 32
IL-8	+935	± 338
HBD-4	+167	± 20
Granzima B	+16	~ 2

Figura 1 - Agrupación jerárquica de los genes implicados en la inflamación

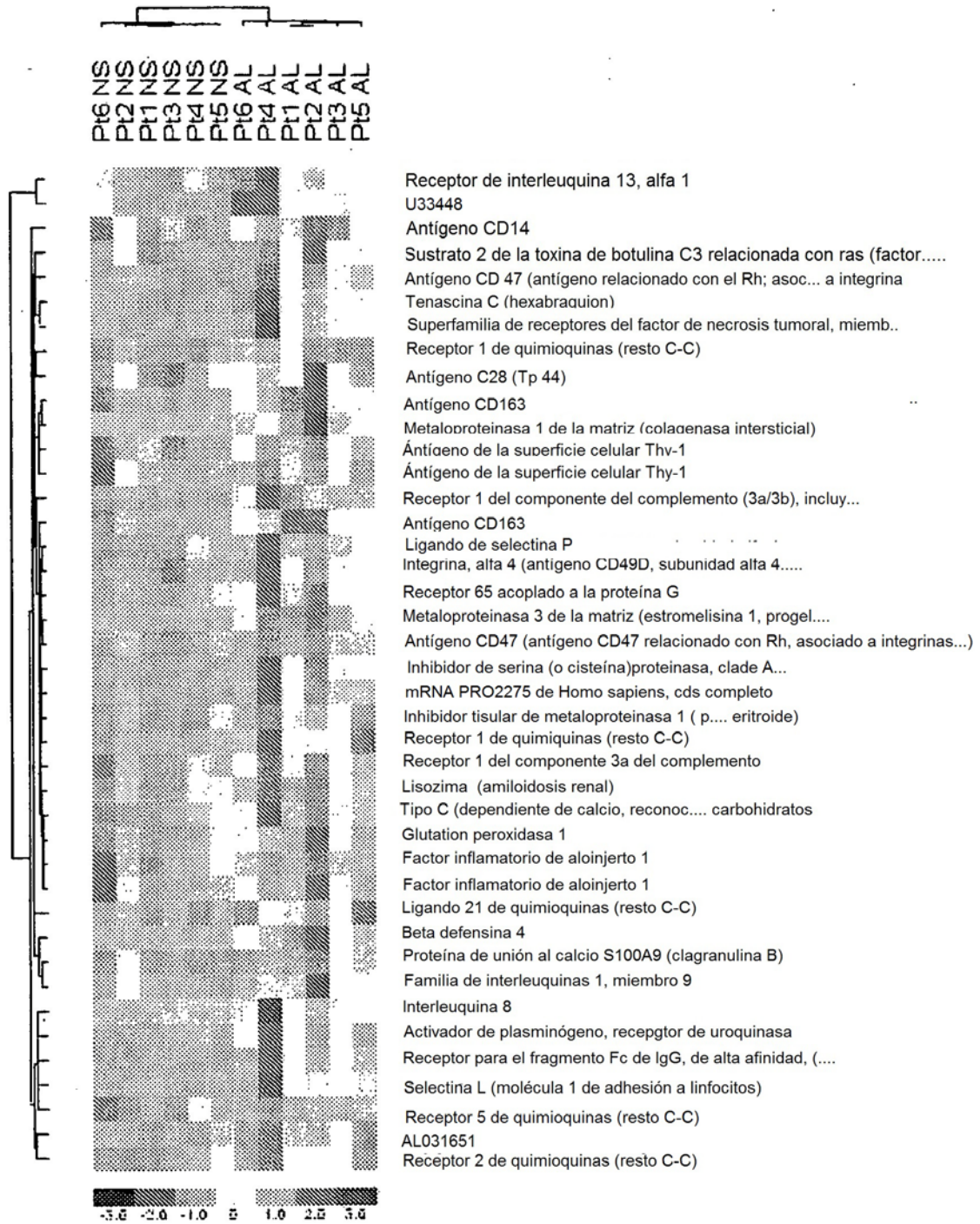


Figura 2 - Inmunohistoquímica para confirmar los datos de biochips con genes

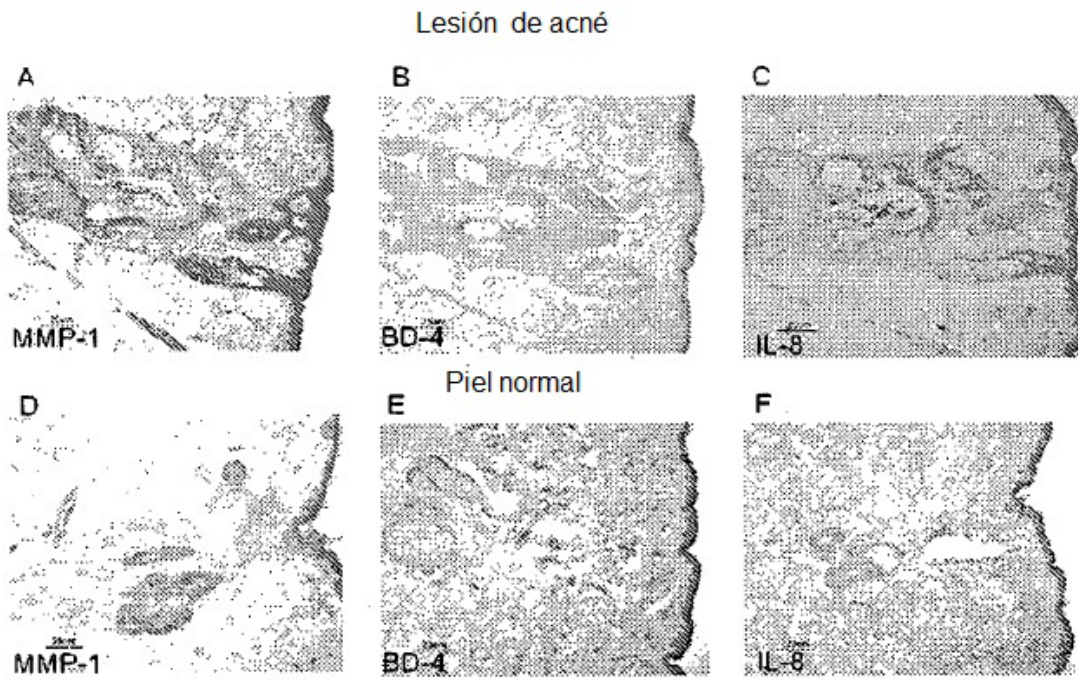


Figura 3 - La inmunorreactividad a MMP-1 está aumentada en lesiones de acné y en zonas de inflamación microscópicas en piel clínicamente normal

