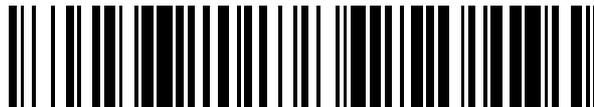


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 614**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2010 E 10834616 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2508605**

54 Título: **Método de selección de agentes que mejoran la piel seca asociada con la dermatitis atópica empleando la actividad de bleomicina hidrolasa como medida**

30 Prioridad:

03.12.2009 JP 2009275909

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

22.07.2015

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 Ginza 7-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**HIBINO, TOSHIHIKO;
KAMATA, YAYOI y
YAMAMOTO, MAMI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 541 614 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de selección de agentes que mejoran la piel seca asociada con la dermatitis atópica empleando la actividad de bleomicina hidrolasa como medida

Campo técnico

- 5 La presente invención proporciona un método para seleccionar y evaluar mejoradores de piel seca, y concretamente la piel seca causada por dermatitis atópica, y un método ex vivo para el diagnóstico de la piel seca causada por dermatitis atópica.

Antecedentes de la técnica

10 Las fibras de queratina presentes en la capa granular de la epidermis se agregan mediante la unión a una proteína denominada como filagrina durante la queratinización y producen una morfología característica denominada "patrón de queratina". Aunque una sustancia precursora de la filagrina conocida como profilagrina (que consiste en una estructura de 10 a 12 unidades de filagrina) está presente en grandes cantidades en los gránulos de queratohialina dentro de las células granulares, junto con la formación de monómeros de filagrina, las fibras de queratina se agregan por desfosforilación durante la queratinización. Posteriormente, las fibras de queratina agregadas se someten a desiminación por la acción de una enzima conocida como peptidil arginina desiminasa (PAD), se liberan como queratina, y posteriormente se descomponen a aminoácidos y similares en la capa superior de la capa córnea. Estos aminoácidos se denominan factores humectantes naturales (NMF), juegan un papel importante en el mantenimiento del contenido de humedad de la capa córnea, y se sabe que poseen la capacidad de absorber la luz ultravioleta (Blank, I.H., J.I. Dermatol., 18, 433 (1952); Blank, I.H., J.I. Dermatol., 21, 259 (1953)).

20 Desde que se determinó que los aminoácidos que funcionan como el componente principal de NMF tenían su origen en la filagrina, se ha realizado la investigación sobre la correlación entre los estados de enfermedad que presentan la piel seca y la filagrina. Se ha determinado recientemente que los niveles de aminoácidos en la capa córnea disminuyen en la piel seca asociada a condiciones tales como la xerosis senil o enfermedades atópicas (Horii, I. et al., Br. J. Dermatol., 121, 587-592 (1989); Tanaka, M. et al, Br J Dermatol, 139, 618-621 (1989)).

25 La PAD desimina la filagrina actuando sobre los residuos de arginina, y los convierte en residuos de citrulina. Como resultado de esta forma de desiminación de la filagrina, la afinidad entre la filagrina y las fibras de queratina se debilita y las fibras de queratina son liberadas, y como resultado de ello, la filagrina se vuelve susceptible a la acción de proteasas, y esto se cree que en última instancia conduce a su descomposición a NMF.

30 El inventor de la presente invención identificó la calpaína 1 como una enzima que descompone la filagrina desiminada por PAD, y determinó que los productos de descomposición de la misma en forma de pequeños fragmentos peptídicos se descomponen en unidades de aminoácidos, es decir NMF, por la bleomicina hidrolasa (BH) (Journal of Investigative Dermatology (2008), Volume 128, Abstracts, S90, 539; Joint Conference of the 30th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Biochemical Society, Collection of Abstracts, p. 583; Journal of Biological Chemistry, 284, No. 19, pp. 12829-12836, 2009, 3P-0251; and, Japanese Patent Application No. 2008-135944 (to be referred to as JP944). Además, ya que tanto la expresión de BH como la actividad de BH están reducidas en la piel lesionada con dermatitis atópica comparada con piel norma, se sugirió que la regulación de BH es importante para la diferenciación terminal de queratinocitos y que un defecto en la ruta de degradación de la filagrina está asociado con la patogénesis de la dermatitis atópica (Kamata, Y. et al., J. Dermatol. Sci., 56, JSID Abstracts, e17 (2009)).

40 Más recientemente, se sabe que algunas dermatitis atópicas están causadas por una anomalía genética del gen de la profilagrina, y esta anomalía genética se observa en aproximadamente del 5% al 50% de los pacientes con dermatitis atópica (Smith, F.J.D., et al., Nat. Genet. 38: 337-342 (2006); Aileen Sandilands, et al., J.I. Dermatol., 127, 1282-1284 (2007); and, Nomura, T. et al., J.I. Dermatol., 128(6): 1436-41 (2008)). Sin embargo, la piel de pacientes con dermatitis atópica no está necesariamente asociada a una disminución dramática en la expresión de la filagrina.

45 Documentos de la técnica anterior

Documentos no patentes

Documento no patente 1: Blank, I.H., J.I. Dermatol., 18, 433 (1952)

Documento no patente 2: Blank, I.H., J.I. Dermatol., 21, 259 (1953)

Documento no patente 3: Horii, I. et al., Br. J. Dermatol., 121, 587-592 (1989)

50 Documento no patente 4: Tanaka, M. et al., Br. J. Dermatol., 139, 618-621 (1989)

Documento no patente 5: Kamata, et al., J. Biochem., 141, 69-76 (2007)

Documento no patente 6: Journal of Investigative Dermatology (2008), Volume 128, Abstracts, S90, 539

Documento no patente 7: Joint Conference of the 30th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Biochemical Society, Collection of Abstracts, p. 583, 3P-0251

Documento no patente 8: Journal of Biological Chemistry, 284, No. 19, pp. 12829-12836, 2009

Documento no patente 9: Kamata, Y. et al., Journal of Dermatological Science, 56, JSID Abstracts, e17 (2009)

5 Documento no patente 10: Smith, F.J.D. et al., Nat. Genet. 38: 337-42 (2006)

Documento no patente 11: Aileen Sandilands, et al., J.I. Dermatol., 127, 1282-1284 (2007)

Documento no patente 12: Nomura, T. et al., Journal of Investigative Dermatology, 128, 1436-41 (2008)

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para seleccionar fármacos que mejoran o previenen la piel seca causada por la dermatitis atópica basado en un nuevo mecanismo de la aparición de piel áspera atribuible a las fluctuaciones en la expresión de una enzima productora de NMF, y un método para el diagnóstico de la piel seca causada por la dermatitis atópica.

Medios para resolver los problemas

15 En la citada JP944, los inventores de la presente invención determinan que el aumento de la actividad de bleomicina hidrolasa mejora la función de barrera de la piel mediante la producción de NMF. De esta manera, se cree que la bleomicina hidrolasa actúa en la etapa final de la producción de NMF. Sin embargo, es interesante observar con respecto a la piel seca debida a la dermatitis atópica que, ya que la expresión de la filagrina continúa observándose en numerosos pacientes de dermatitis atópica, se prevé que este fenómeno esté causado por otra anomalía al gen de la filagrina.

Basándose en la hipótesis de que la disminución de la expresión de bleomicina hidrolasa en la piel humana no sólo está relacionada con una disminución de la función barrera de la piel debido a una anomalía en el mecanismo por el cual se producen NMF, sino también con la dermatitis atópica causada principalmente por un trastorno inmune o la piel seca y similares causados por la dermatitis atópica, los inventores de la presente invención verificaron fluctuaciones en la expresión de esta enzima mediante la realización de pruebas en piel seca en seres humanos y analizaron el mecanismo por el cual se controla su expresión. Como resultado, los inventores de la presente invención encontraron que la disminución de la expresión de bleomicina hidrolasa está relacionada con la piel seca causada por dermatitis atópica, y que una región de control que induce claramente la expresión de la enzima está presente en la región flanqueante 5' de un gen que codifica esa enzima. Más específicamente, los inventores de la presente invención clonaron la región flanqueante 5' de BH. Se identificó una región importante para la actividad del promotor de BH 216 pb aguas arriba en un análisis de delección del mismo. Un ensayo de cambio de la movilidad electroforética demostró claramente que MZF-1, Sp-1 y factor regulador de interferón (IRF) -1/2 son capaces de unirse a esta región in vitro. Por otra parte, la actividad del promotor de BH disminuyó considerablemente cuando se indujo una mutación dirigida en los motivos MZF-1 y Sp-1. Estos datos sugirieron que la expresión de BH se regula al alta mediante MZF-1 y Sp-1. Es interesante observar que la citoquina Th1, el interferón (IFN) - γ disminuyen significativamente la expresión de BH. El efecto inhibitorio de IFN- γ sobre la expresión de BH se demostró en un análisis utilizando mutagénesis dirigida y ARN pequeño de interferencia. Aunque la citoquina Th2, IL-4, no demostraron acción directa alguna sobre la expresión de BH, regularon negativamente MZF-1 y Sp-1 en los queratinocitos cultivados. Por lo tanto, esto sugiere que la IL-4 es capaz de actuar como supresora de la regulación de BH. Por último, se investigó la expresión de BH en la piel de pacientes que padecen DA. Ya que la actividad y la expresión de BH disminuyeron considerablemente en la piel afectada por DA, se sugirió que había un defecto en la ruta de descomposición de la filagrina en DA. Como se ha descrito anteriormente, los inventores de la presente invención encontraron que la transcripción de BH probablemente se regula tanto durante la diferenciación como durante la inflamación, lo que conduce al fin de la presente invención.

45 Por lo tanto, la presente solicitud incluye las invenciones indicadas a continuación.

(1) Un método in vitro para seleccionar y evaluar mejoradores de la piel seca causada por la dermatitis atópica que se lleva a cabo en células cultivadas, que comprende evaluar un fármaco candidato como un mejorador de la piel seca causada por la dermatitis atópica en el caso de que el fármaco candidato aumente significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en comparación con un fármaco de control, donde la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa se considera que ha aumentado significativamente en caso de que la actividad de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa haya aumentado significativamente en comparación con la de control, y donde la actividad de la transcripción se considera que ha aumentado significativamente en caso de que la actividad de unión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1 y/o GATA-1 a la región reguladora de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa haya aumentado significativamente en comparación con la de control.

(2) Un método ex vivo para diagnosticar la predisposición a la piel seca causada por la dermatitis atópica, que comprende determinar una tendencia hacia la piel seca causada por la dermatitis atópica en caso de que la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en el tejido de la piel disminuya significativamente en comparación con la de la piel de control, mientras se determina la ausencia de una tendencia hacia la piel seca causada por la dermatitis atópica si es igual o mayor que la de la piel de control, donde la expresión y/o actividad se considera que ha disminuido significativamente en el caso de que la actividad de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa haya disminuido significativamente en comparación con la de control, y donde la actividad de la transcripción se considera que ha disminuido significativamente en el caso de que la actividad de unión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1 y/o GATA-1 a la región reguladora de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa haya disminuido significativamente en comparación con la del control.

Efectos de la invención

Se pueden encontrar nuevos mejoradores de la piel seca causada por la dermatitis atópica basados en el nuevo mecanismo de la aparición de la piel seca establecido por la presente invención atribuible a las fluctuaciones en la expresión de la bleomicina hidrolasa, y concretamente en un sistema de selección que utiliza la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa como un indicador. Además, también se considera que el método de la invención de la presente solicitud es aplicable a la búsqueda de mejoradores de la piel seca ordinaria no causada por la dermatitis atópica. De hecho, como se describe en ejemplos de la presente solicitud, en un grupo que muestra bajos niveles de expresión y/o actividad de bleomicina hidrolasa, la función barrera de la piel (pérdida de agua transepidérmica: TEWL) disminuyó significativamente junto con una disminución en el contenido de humedad la capa córnea.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1 muestra ensayos de inmunotransferencia que indican la relación entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y el número de tiras adhesivas de los extractos de piel humana obtenidos arrancando las tiras adhesivas "tape stripping".
- Figura 2 muestra un ensayo de inmunotransferencia que indica la relación entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y la piel seca en los extractos de piel humana. T y A representan muestras obtenidas de sujetos que no perciben sequedad, N representa una muestra obtenida de un sujeto que percibe un cierto grado de sequedad, y M representa una muestra obtenida de un sujeto que percibe sequedad.
- Figura 3 es un gráfico que indica la relación entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y la actividad enzimática de la misma en extractos de la capa córnea obtenidos de brazos humanos. Los números en el eje horizontal indican los números de identificación de los sujetos.
- Figura 4 indica una aproximación de primer orden de la relación entre las cantidades y actividades de bleomicina hidrolasa obtenidas en la figura 3 como se determina según con el método de los mínimos cuadrados.
- Figura 5 indica los análisis estadísticos relacionados con la bleomicina hidrolasa presente en extractos de la capa córnea obtenidos de brazos humanos y parámetros de la piel (A: aminoácidos libres, B: actividad, C: TEWL). BH baja: nivel de bleomicina hidrolasa < 10, actividad < 1,5 (nmol/min/ml); BH alto: nivel de bleomicina hidrolasa ≥ 10, actividad ≥ 1,5 (nmol/min/ml).
- Figura 6 es un diagrama de flujo de una encuesta utilizada para clasificar la piel.
- Figura 7 muestra los resultados de medir parámetros de la capa córnea de la piel obtenida de sujetos clasificados según el diagrama de flujo de la figura 6.
- Figura 8 muestra imágenes de la tinción de tejidos que indican la localización de bleomicina hidrolasa y de filagrina en la piel normal.
- Figura 9 muestra imágenes de la tinción de tejidos que indican la localización de bleomicina hidrolasa y de filagrina en la piel de un paciente con dermatitis atópica.
- Figura 10 es un gráfico que indica la relación entre la diferenciación de los queratinocitos y el nivel de expresión de bleomicina hidrolasa determinada mediante PCR cuantitativa. Los valores en el eje vertical representan cantidades relativas basadas en un valor de 1 para el nivel de expresión de confluencia del 80%.
- Figura 11 es un diagrama esquemático que muestra una región flanqueante 5' de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa.
- Figura 12 es un gráfico que indica los resultados de un ensayo de luciferasa de promotores de BH utilizando queratinocitos epidérmicos humanos.
- Figura 13 muestra gráficos que indican la relación entre la expresión de los factores de transcripción SP1, MZF-1 y GATA-1 y la irradiación UV.

Figura 14 muestra gráficos que indican la relación entre los niveles de expresión de bleomicina hidrolasa y proteasas y la irradiación UV en los queratinocitos epidérmicos humanos normales.

Figura 15 muestra los cebadores utilizados para preparar mutantes de delección 5' continuos de una región flanqueante 5' de BH mediante PCR.

- 5 Figura 16 muestra cebadores utilizados para analizar los niveles de transcripción de BH y factores relacionados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Figura 17 muestra las sondas utilizadas para analizar el cambio en la movilidad electroforética.

- 10 Figura 18A muestra un diagrama esquemático de una región flanqueante 5' de BH humano. Se determinaron los sitios de unión del factor de transcripción putativo dentro de la región flanqueante 5' mediante una búsqueda usando el programa Genoma Net MOTIF. Figura 18B muestra regiones promotoras de BH determinadas por análisis de delección. En la figura 18C se muestran los sitios de unión del factor de transcripción putativo que indican la secuencia de nucleótidos de una región desde -216 hasta -1 que incluye la mínima secuencia de promotor de BH y los sitios de unión de la región de transcripción putativa.

- 15 Figura 19A indica la caracterización de los sitios de unión del factor de transcripción en los promotores de BH por mutagénesis dirigida, un diagrama esquemático de construcciones de delección de sitios de unión del factor de transcripción putativo, y la actividad de luciferasa de los mismos en los queratinocitos cultivados. Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida en construcciones que abarcan la secuencia de nucleótidos de la región desde -616 hasta +1. Figura 19B indica la unión de MZF-1, Sp-1, GATA-1 o IRF-1/2 al elemento de acción cis de los promotores de BH. El experimento se llevó a cabo con un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando un extracto nuclear a partir de queratinocitos cultivados y una sonda de oligonucleótidos de doble cadena biotinilada que contiene el sitio de unión del factor de transcripción putativo MZF-1, Sp-1, GATA-1 o IRF-1/2. El carril 1 indica el perfil de unión de la sonda biotinilada en el extracto nuclear, mientras que el carril 2 indica el perfil de unión de la sonda biotinilada tras competir con una sonda no marcada presente en una cantidad en exceso igual al doble de la cantidad de la sonda biotinilada.

- 25 Figura 20A muestra los resultados del análisis RT-PCR en tiempo real de la expresión de BH. Los gráficos indican los efectos de las citoquinas Th1, Th2 y Th17 sobre la expresión del gen BH. Figura 20B muestra los resultados de los análisis de mutación de los sitios de unión IRF-1/2. Los gráficos indican la actividad del promotor de BH en queratinocitos cultivados en presencia de IFN- γ . Los queratinocitos se transfectaron con pGL3-216 que contenían sitios de unión intactos de IRF-1/2 de regiones promotoras de BH seguido de tratamiento durante 24 horas con IFN- γ (panel superior). Los queratinocitos se transfectaron con Δ pGL3-616 (mutantes de delección de IRF-1/2) seguido de tratamiento durante 24 horas en presencia o ausencia de IFN- γ o IL-4 a 10 ng/ml (panel inferior). Figura 20 (C) muestra los resultados de medir los niveles de expresión de los genes IRF-1 e IRF-2 utilizando ARN pequeño de interferencia (ARNsi) para considerar si IRF-1/2 son o no mediadores esenciales de la regulación a la baja de BH inducida por IFN- γ . Los queratinocitos se transfectaron con ARNsi (40 nM) de IRF-1 o IRF-2 seguido de cultivo durante 24 horas, tratamiento con IFN- γ a 10 ng/ml y aislamiento del ARN después de cultivar durante 24 horas más. El panel de la derecha indica los efectos silenciadores de IRF-1 e IRF-2.

- 40 Figura 21A muestra los resultados de un análisis de expresión de BH, calpaína y factores de transcripción putativos en células proliferativas o diferenciadas por PCR en tiempo real para investigar el mecanismo de control de la transcripción en la epidermis. Figura 21B muestra los resultados de un análisis de los patrones de expresión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1, GATA-1, IRF-1 e IRF-2 en los queratinocitos cultivados.

Figura 22A indica los efectos de IFN- γ sobre la expresión de los factores de transcripción putativos IRF-1 e IRF-2. Figura 22B indica los efectos de la IL-4 sobre la expresión de los factores de transcripción putativos IRF-1, IRF-2, MZF-1 y Sp-1.

- 45 Figura 23A indica la localización simultánea de BH y filagrina en la capa granular como se demuestra por una tinción doble con anticuerpo anti-BH y anticuerpo anti-filagrina en la epidermis normal. Figura 23B indica las actividades de BH de extractos obtenidos de piel afectada y piel no afectada de un paciente de DA.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 50 En su más amplio sentido la invención se define por las reivindicaciones anexas. En un primer aspecto de la misma, la presente invención proporciona un método in vitro para seleccionar y evaluar mejoradores de la piel seca causada por la dermatitis atópica que se lleva a cabo en células cultivadas, que comprende evaluar un fármaco candidato de ser un mejorador de la piel seca causada por la dermatitis atópica en el caso de que el fármaco candidato aumente significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en comparación con un fármaco de control.

- 55 La bleomicina hidrolasa es una cisteín peptidasa citoplasmática que tiene un peso molecular de 250 kDa a 280 kDa (hexámero), y que inicialmente se pensaba que tenía la función de desactivación del glicopéptido bleomicina utilizado frecuentemente en la quimioterapia de combinación para el cáncer. La bleomicina hidrolasa contiene un residuo de sitio activo característico de las cisteín proteasas pertenecientes a la superfamilia de la papaína, y su

gen de codificación está presente en el locus génico 17q11.2 en los seres humanos (Takeda, et al., J. Biochem., 119, 29-36, 1996). Está presente en todos los tejidos, y aunque también se sabe que está presente en la piel (Kamata, et al., J. Biochem., 141, 69-76, 2007), su relación con la filagrina era completamente desconocida antes de la determinación la misma por el inventor de la presente invención.

5 Basándose en los resultados de la tinción de tejidos, se determinó que la bleomicina hidrolasa se expresa en grandes cantidades en la capa superior de la epidermis en piel normal de la misma manera que la filagrina (figura 8). Por otro lado, la expresión de la bleomicina hidrolasa y la filagrina disminuye en los lugares de erupciones atópicas en pacientes con dermatitis atópica (figura 9). Esto sugiere fuertemente que una anomalía en este sistema enzimático, y no una anomalía del gen de la profilagrina, es la causa de la dermatitis atópica. Además, la actividad de la bleomicina hidrolasa es significativamente menor no sólo en las zonas afectadas, sino también las áreas no afectadas, en la piel de pacientes con dermatitis atópica (datos no mostrados).

Además, como resultado del estudio de las fluctuaciones en los niveles de expresión de la bleomicina hidrolasa utilizando los queratinocitos cultivados, a diferencia que esta enzima no se expresa a niveles altos en los queratinocitos no diferenciados, se encontró que se expresaba altamente los queratinocitos diferenciados que habían alcanzado la confluencia, casi no se expresa en absoluto en las células basales, y se expresaba mucho en células en las que la diferenciación había progresado y se habían transformado en células de la epidermis (figura 10). Este resultado apoya el resultado obtenido a partir de la tinción de células como se describió anteriormente.

La medida de la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa se puede llevar a cabo cuantitativamente o cualitativamente midiendo la expresión y/o actividad de esta enzima, mediante un método de inmunoensayo que utiliza un anticuerpo específico para la bleomicina hidrolasa, cuyos ejemplos incluyen ELISA usando un marcador enzimático, RIA usando un marcador radiactivo, inmunonefelometría, ensayo de inmunotransferencia, aglutinación de látex y hemaglutinación. Los ejemplos de tipos de inmunoensayos incluyen ensayos competitivos y ensayos de tipo sándwich. Más específicamente, la medida de la actividad mencionada anteriormente se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, utilizar la propiedad de la citrulina de ser un sustrato casi específico para la bleomicina hidrolasa, y evaluar la descomposición de su sustrato fluorogénico, Cit-MCA, con un espectrofotómetro de fluorescencia. La medida de la cantidad de bleomicina hidrolasa también se puede llevar a cabo midiendo el nivel de expresión de un gen que codifica la enzima. En este caso, el nivel de expresión de la bleomicina hidrolasa se determina preferiblemente midiendo la cantidad de ARNm que codifica la bleomicina hidrolasa dentro de las células. La extracción del ARNm y la medida cuantitativa o cualitativa de la cantidad del mismo son conocidas en la técnica, y se puede llevar a cabo por diversos métodos conocidos, tales como PCR, 3SR, NASBA o TMA. Además, la bleomicina hidrolasa también se puede determinar cualitativamente mediante hibridación in situ o mediante la medida de la actividad biológica de la misma.

En el método in vitro para la selección y evaluación de mejoradores de la piel seca causada por la dermatitis atópica que se lleva a cabo en células cultivadas en la presente invención, se evalúa un fármaco candidato de ser un mejorador de la piel seca causada por la dermatitis atópica en el caso de que el fármaco candidato aumente significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en comparación con un fármaco de control. Los fármacos seleccionados según el método de la presente invención se consideran eficaces para la piel seca, y en particular para la piel seca causada por la dermatitis atópica.

Según las directrices para el examen y tratamiento de la dermatitis atópica de la Asociación Dermatológica de Japón, la "dermatitis atópica" se define como una enfermedad asociada a la dolencia primaria del eczema pruriginoso que experimenta exacerbación repetida y mejora, y se puede diagnosticar basándose en la presencia o ausencia de prurito, y en función de la erupción característica la misma, la presencia de lesiones agudas tales como eritema, eritema supurante, pápulas, pápulas serosas, escamas o costras, así como lesiones crónicas como eritema infiltrante, lesiones liquenificadas, prurigo, escamas o costras. Cuando se utiliza en la presente descripción, "piel seca causada por dermatitis atópica" se refiere a la piel seca asociada con la dermatitis atópica que se ha diagnosticado definitivamente según la definición antes mencionada, incluyendo anomalías genéticas del gen de la filagrina.

Los ejemplos de un método de selección incluyen un método que consiste en medir un aumento en la expresión de ARNm que codifica la bleomicina hidrolasa en presencia de un fármaco que se va a probar, y un método que consiste en insertar una secuencia de promotor implicado en la expresión de la bleomicina hidrolasa en un vector génico de luciferasa, y medir directamente el grado de expresión en la forma de un sistema de ensayo de promotor. En este último caso, se utiliza preferentemente una región de -216 pb a -816 pb en la cual la expresión de BH alcanza un máximo para la región promotora de BH. Además, se puede utilizar una proteína fluorescente tal como Azami-Green comúnmente utilizada en la técnica para medir el nivel de expresión en lugar de la luciferasa. La acción de un fármaco sobre la expresión de BH se puede medir introduciendo un vector que contiene un gen de fusión de los mismos en las células, cultivando las células en presencia de un fármaco, lisando las células normalmente tras 24 horas y midiendo la actividad de la luciferasa. Aunque se pueden utilizar como células utilizadas para la medición queratinocitos epidérmicos humanos normales disponibles comercialmente (NHEK, tales como los disponibles de Kurabo Industries, Ltd.) o células HaCaT inmortalizadas y similares, las células utilizadas no se limitan a estas. La medida de la actividad de la luciferasa se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de un kit de ensayo de luciferasa tal como el disponible de Roche Diagnostics K.K.

5 Cuando se utiliza en la presente descripción, "aumenta significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en comparación con un fármaco de control" se refiere al caso en el que el nivel de expresión medido, la actividad de la bleomicina hidrolasa o ambas es de 120% o más, 150% o más, o 200% o más, respectivamente, en comparación con un fármaco que no tiene un efecto de mejora sobre la piel seca, y particularmente un efecto de mejora sobre la piel seca causada por la dermatitis atópica.

10 Según la presente invención el aumento de la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa se logra mediante el aumento de la actividad de la transcripción de un gen que codifica la enzima. Una región flanqueante 5' de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa, y en particular una región reguladora de la transcripción, y los factores de transcripción que se unen a esa región, se muestran en la figura 11. La región reguladora de la transcripción mencionada anteriormente tiene una región que se extiende de 216 pb a 1216 pb aguas arriba de la secuencia que codifica la enzima. La región reguladora de la transcripción contiene preferiblemente una región que se extiende 816 pb aguas arriba desde el punto de vista de obtener un alto nivel de actividad de la bleomicina hidrolasa.

15 Una región que se extienda al menos 216 pb aguas arriba de la secuencia que codifica la bleomicina hidrolasa tiene que estar incluida para expresar esta enzima. Entre los factores de transcripción descritos en la figura. 11, se cree que la expresión de la bleomicina hidrolasa se aumenta incrementando las actividades de unión de IRF-1, IRF-2, MZF-1, Sp-1 y GATA-1 contenidas en esta región. De hecho, cuando la expresión de la bleomicina hidrolasa se incrementa irradiando con luz ultravioleta (UV) (datos no mostrados), se observa una correlación entre los niveles de expresión de MZF-1 y GATA-1 y la intensidad de UV y el tiempo de irradiación (figura 13).

20 Aquí, en el caso de que la actividad de transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa, es decir la actividad de unión del factor de transcripción MZF-1, Sp-1 y/o GATA-1 a la región reguladora de la transcripción de ese gen, se aumente significativamente por un fármaco candidato, en 120% o más, 150% o más o 200% o más, respectivamente, en comparación con un fármaco de control, el nivel de expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa se puede considerar que aumenta significativamente.

25 La expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa también se ve afectada por las citoquinas. Por ejemplo, la interleuquina-4 (IL-4), que se sabe que está implicada en la dermatitis atópica y es una citoquina de tipo Th2, regula a la baja la expresión de la bleomicina hidrolasa. Esto coincide con el bajo nivel de expresión de la bleomicina hidrolasa observado en la piel de pacientes con dermatitis atópica. Por otro lado, el interferón- γ , que es una citoquina Th1 típica que tiene la acción opuesta de IL-4 de inhibir la producción de IgE, aumenta significativamente la expresión de bleomicina hidrolasa. Además, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que es una citoquina Th2 representativa de citoquinas inflamatorias, también aumenta significativamente la expresión de esta enzima. Además de estas sustancias, la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa también se aumenta por la irradiación UV. Aunque los resultados de los mismos no se muestran, se ha confirmado que la actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel de las mejillas o en otra zona en el cuerpo susceptible a la irradiación ultravioleta aumenta por irradiación UV.

35 La presente solicitud además proporciona un método para mejorar o prevenir la piel seca causada por dermatitis atópica aumentando significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en el tejido de la piel.

40 En el método para mejorar o prevenir la piel seca causada por la dermatitis atópica, se aumenta significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel en comparación con, por ejemplo, la expresión y/o actividad en la piel antes de someterse a este método de tratamiento. "Aumenta significativamente" se refiere al caso en el que, por ejemplo, la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa sean de un valor de 120% o más, 150% o más o 200% o más.

45 En el método, se usa un fármaco arbitrario que aumenta significativamente la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa. Además, no hay limitaciones sobre el fármaco siempre que aumente la expresión y/o actividad de esta enzima. El fármaco y similares utilizados en el método se pueden aplicar a la piel de forma arbitraria siempre que se pueda aplicar a la piel y sea capaz de lograr el objeto de la presente invención, y el fármaco se puede aplicar solo o se puede aplicar mediante la incorporación de otros componentes arbitrarios. Además, no hay limitaciones en la ubicación de la piel donde se aplica el fármaco, e incluye cualquier piel en la superficie del cuerpo, incluyendo el cuero cabelludo.

50 En un segundo aspecto de la misma, la presente invención proporciona un método ex vivo para diagnosticar la predisposición a la piel seca causada por la dermatitis atópica, que comprende determinar una tendencia hacia la piel seca causada por la dermatitis atópica en el caso de que la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en el tejido de la piel se reduzca significativamente en comparación con la de la piel de control, mientras se determina la ausencia de una tendencia a la piel seca causada por la dermatitis atópica si es igual o mayor que la de la piel control. El método se lleva a cabo como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

55 El que la piel de un sujeto esté seca o no se puede considerar basándose en la subjetividad del sujeto o el médico y similares, o se puede considerar objetivamente midiendo el contenido de humedad de la piel usando un analizador de humedad de la superficie de la piel. Por ejemplo, como se explica en el experimento 3 de la presente descripción, si un sujeto tiene la piel seca o no también se puede considerar según la subjetividad de un sujeto basándose en la grasa, la susceptibilidad al secado y similares según el diagrama de flujo descrito en la figura 6.

Aunque la piel seca se puede evaluar fácilmente, considerar si la piel de un sujeto está predispuesta a la piel seca causada por la dermatitis atópica puede ser difícil. Según el método ex vivo de diagnóstico de la presente invención, se puede hacer un diagnóstico no sólo del estado actual de la piel de un sujeto, sino también en cuanto a si el sujeto es susceptible a la piel seca causada por la dermatitis atópica o no.

5 "La expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en el tejido de la piel se reduce significativamente en comparación con la de la piel de control" se refiere al caso en el que la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa medida es del 80% o menos, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 30% o menos o 10% o menos en comparación con, por ejemplo, "piel de control" normal que se considera piel húmeda por un médico desde una perspectiva dermatológica. "Igual o mayor que el de la piel de control" se refiere al caso en el que la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa medida es, por ejemplo, 80% o más, 90% o más o 100% o más en comparación con, por ejemplo, "piel de control" normal que se considera piel húmeda por un médico desde una perspectiva dermatológica.

15 Aunque la toma de una muestra de la capa córnea de la piel para servir como un espécimen se puede llevar a cabo mediante un procedimiento arbitrario, es preferible "tape stripping" desde el punto de vista de la conveniencia. "Tape stripping" se refiere a un método por el cual una muestra de la capa córnea se recoge mediante la adhesión de un trozo de cinta adhesiva sensible a la presión a la capa superficial de la piel y despegando la cinta de modo que la capa córnea de la piel se adhiere a la cinta adhesiva sensible a la presión despegada. El uso del método de "tape stripping" hace que sea posible medir la expresión y la actividad de la bleomicina hidrolasa simplemente mediante el muestreo de la capa córnea con un sol trozo de la cinta, lo que permite evaluar de forma no invasiva la piel seca causada por la dermatitis atópica utilizando la bleomicina hidrolasa como indicador. En un método preferible que emplea "tape stripping", la capa superficial de la piel se limpia primero con etanol, por ejemplo, para eliminar la materia sebácea, la suciedad y similares, se coloca suavemente una pieza de cinta adhesiva sensible a la presión cortada con un tamaño adecuado (como 5 cm x 5 cm) sobre la superficie de la piel, se presiona todo el trozo de cinta sobre la superficie de la piel mediante la aplicación de una presión uniforme, y se despega posteriormente la cinta adhesiva sensible a la presión mientras se aplica una fuerza uniforme. La cinta adhesiva sensible a la presión puede ser una cinta de celofán disponible comercialmente, y ejemplos de cinta adhesiva sensible a la presión que se pueden usar incluyen Scotch Super Strength Mailing Tape (3M) y cinta de celofán (CelloTape®, Nichiban).

A continuación se proporciona una explicación más detallada de la presente invención haciendo una lista de ejemplos específicos de la misma. Además, la presente invención no se limita por estos ejemplos específicos.

30 Ejemplos

Se utilizaron los siguientes materiales en los experimentos.

La calpaína I se adquirió de EMD Biosciences Inc. La bleomicina hidrolasa se preparó a partir de la capa córnea epidérmica humana según el documento no patente 5. La IL-4 y la IFN- γ humanas se adquirieron de Peprotech EC (Londres, Inglaterra). La IL-13 y la IL-17A/F humanas se produjeron por R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). La citrulina-4-metilcoumaril-7-amida (Cit-MCA) se adquirió de Bachem Bioscience Inc. (Bubendorf, Suiza). Se utilizaron productos de grado reactivo para todas las otras sustancias químicas utilizadas.

El cultivo de queratinocitos

40 Los queratinocitos epidérmicos humanos normales derivados de epidermis neonatal (Kurabo, Osaka, Japón) se cultivaron en un medio EpiLife (Cascade Biologics, Portland, OR) que contiene baja concentración (0,03 mM) de calcio y el suplemento de crecimiento HKGS (Cascade Biologics). Todas las células se incubaron a 37°C mientras se les suministra 5% de CO₂ y se utilizaron dentro de 4 conductos. Las células se recogieron con una confluencia de 70%, con una confluencia de 100%, 2 días después de la confluencia y 2 días después de la confluencia en calcio 2 mM.

Experimento 1

45 Se cree que la bleomicina hidrolasa actúa en la etapa final de la producción de NMF. En este caso, existe la posibilidad de que la expresión de esta enzima disminuya en la piel seca. En este experimento, se realizó un estudio para saber si una disminución de la expresión y/o actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel estaba relacionada con la piel seca o no.

50 Se recogieron muestras de la capa córnea epidérmica por "Tape stripping" que consiste en adherir cinta adhesiva transparente sensible a la presión (CelloTape®, Nichiban) a una superficie de la piel en el brazo y continuación despegar la cinta. La cinta adherida con la capa córnea epidérmica se cortó en trozos, se sumergió en un amortiguador de extracción (Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), NaCl 0,14 M, 0,1% de Tween-20, 1 ml), y se sometió a tratamiento ultrasónico para preparar un extracto de la capa córnea. Entonces se sometió el extracto de capa córnea a un ensayo de inmunotransferencia. El anticuerpo anti-bleomicina hidrolasa (BH) utilizado se preparó según el método de Kamata, et al. (Journal of Biological Chemistry, 2009). Más específicamente, el extracto de la capa córnea se sometió a electroforesis en SDS seguido de transferencia a Immobilon-P (Millipore), y tras lavar la película transferida, se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-BH. Tras retirar el anticuerpo mediante lavado adicional, se permitió que la película reaccionase con el anticuerpo secundario unido a

HRP. Tras el lavado, se imprimieron en una película de rayos X las bandas de la proteína de BH que se hicieron luminiscentes con el kit de detección ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare), y los niveles de expresión se estimaron en base a la intensidad de las mismas. Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

5 En la Figura 1, la muestra 1 es una muestra de la capa córnea de la piel de un sujeto que se considera que tiene la piel seca según el criterio del sujeto, mientras que la muestra 2 es una muestra de la capa córnea de la piel de un estudiante sano que no se considera que tiene la piel seca. Además, las muestras T y A en la figura 2 pertenecen a sujetos que no perciben tener la piel seca, la muestra N pertenece a un sujeto que percibe que tiene la piel un poco seca, y la muestra M era de un sujeto que percibe que tiene la piel seca. El nivel de expresión de bleomicina hidrolasa en la muestra 1 es bajo, mientras que el nivel de expresión de la misma en la muestra 2 es alto. En base a esto, se puede determinar que las muestras 1 y 2 derivan de piel seca y piel húmeda, respectivamente. Además, según los resultados utilizando la muestra 1, se puede determinar que en la piel seca la cantidad de bleomicina hidrolasa disminuye más cerca a la superficie de la piel que sirve como lugar de producción de NMF. En el ensayo de inmunotransferencia de la figura 2, las muestras T y A indican extractos obtenidos de sujetos que no perciben particularmente la piel seca, mientras que las muestras N y M son extractos de sujetos que eran considerablemente conscientes de tener la piel seca.

Experimento 2

En este experimento, se realizó un estudio de las diferencias individuales en la cantidad y actividad de la bleomicina hidrolasa en la piel humana y la correlación entre la cantidad y la actividad de esta enzima. Los extractos de la capa córnea se prepararon a partir de la piel de 40 estudiantes de sexo femenino con edades comprendidas entre los 20 y los 25 años de edad según el método descrito en el Experimento 1. Las cantidades de bleomicina hidrolasa en los extractos y la actividad de los mismos se midieron según el método de Kamata, et al. (J. Biol. Chem., Vol. 284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009). Los niveles de expresión se evaluaron por ensayo de inmunotransferencia, mientras que la actividad aminopeptidasa de la enzima se evaluó midiendo la cantidad de Cit- β -NA descompuesta utilizada para el sustrato fluorogénico. Los resultados se muestran en la figura 3, y un diagrama de correlación de los mismos se muestra en la figura 4. Como se desprende de los resultados representados en la figura 4, existe una correlación entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y la actividad de la misma.

A continuación, se llevó a cabo un análisis estadístico de la bleomicina hidrolasa y diversos parámetros de la piel para los extractos de la capa córnea antes mencionados. En este experimento, los extractos de la capa córnea de 40 sujetos se clasifican en los dos tipos siguientes. Después de convertir las cantidades de bleomicina hidrolasa determinadas a partir de los resultados del ensayo de inmunotransferencia en valores numéricos con un densitómetro, los extractos que tienen una cantidad de bleomicina hidrolasa inferior a 10 en el caso de utilizar un valor de "1" como una unidad arbitraria y que tienen una actividad enzimática inferior a 1,5 nmol/min/ml se clasificaron como de nivel bajo de proteína bleomicina hidrolasa y de actividad baja (BH baja), mientras que todos los otros extractos se clasificaron como de nivel alto de proteína y de actividad alta (BH alta).

35 Se midieron los aminoácidos libres según el método de Kamata, et al. (J. Biol. Chem., Vol. 284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009). Más específicamente, se dejó reaccionar el péptido de la filagrina descompuesto con calpaína I con cada extracto seguido de la cuantificación de la cantidad de grupos amino utilizando Fluorescamina y midiendo la cantidad de aminoácidos libres. Los resultados de la medición de aminoácidos libres se muestran en la figura 5A. Las unidades del eje vertical en la figura 5A representan la cantidad total de aminoácidos libres (nmol) en 3 ml de muestra de medición.

Como se ha descrito anteriormente, se evaluó la actividad la bleomicina hidrolasa como actividad aminopeptidasa de la enzima midiendo la cantidad de Cit- β -NA que sirve como un sustrato fluorogénico descompuesta. Los resultados de medir la actividad de la bleomicina hidrolasa se muestran en la figura 5B. Las unidades del eje vertical de la figura 5B representan la cantidad de Cit- β -NA descompuesta (nmol/min/ml).

45 Los niveles de la TEWL en la piel de las estudiantes mencionadas se estaban midiendo usando un Vapometer (Delfin Technologies, Ltd., Finlandia), y se indican en g/m²/h. Los resultados de medir los niveles de la TEWL se muestran en la figura 5C.

Como se muestra en la figura. 5C, existía una diferencia significativa en los niveles de humedad de la capa córnea entre el grupo que tiene actividad baja de la bleomicina hidrolasa (2,5 U <) y el grupo alto. Además, en el grupo en el que tanto la cantidad como la actividad de esta enzima eran bajas, los niveles de aminoácidos libres eran bajos y los niveles de la TEWL eran altos (figuras 5A y 5C).

Aunque no se muestran los datos, había diferencias significativas en las cantidades de NMF y ácido urocánico entre el grupo de aminoácidos libres bajo (1000 <) y el grupo de aminoácidos libres alto, mientras que había una diferencia significativa en los niveles de ácido urocánico entre el grupo de NMF bajo (0,8 <) y el grupo de NMF alto. Además, había diferencias significativas en NMF, ácido láctico y urea entre el grupo de TEWL baja (2,5 <) y el grupo de TEWL alta. Si se considera que el ácido urocánico se produce a partir de la histidina que está presente en grandes cantidades en la filagrina, se puede determinar que la bleomicina hidrolasa desempeña un papel importante en la descomposición de la filagrina.

En base a los resultados de este experimento, se puede determinar que tanto los niveles de aminoácidos libres como la función de barrera disminuyen significativamente en el caso de una cantidad absoluta baja de bleomicina hidrolasa. Aunque no se muestran los datos, incluso en el caso de usar un extracto de capa córnea obtenido de la mejilla, se confirmó que existe una relación proporcional entre la cantidad de bleomicina hidrolasa y la función de barrera.

Experimento 3

En este experimento, se realizó una encuesta entre las estudiantes mencionadas en base al diagrama de flujo mostrado en la figura 6, y la piel de las estudiantes se clasificó dentro de una de las cuatro categorías que consisten en piel húmeda, piel seca, piel grasa seca y piel grasa. Los resultados de este estudio y la correlación con los resultados para los parámetros de la piel medidos en el Experimento 2 antes mencionado se muestran en la figura 7. En base a la figura 7, se determinó que la actividad de la bleomicina hidrolasa de las estudiantes clasificadas como que tenían la piel grasa seca era significativamente alta.

Experimento 4

En este experimento, se hizo un estudio de la localización de la bleomicina hidrolasa y la filagrina en la piel.

Tinción inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo según el método de Kamata, et al. (J. Biol. Chem., Vol. 284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009). Para las muestras se utilizaron secciones congeladas de piel humana que tienen un espesor de 5 μm e IgG anti BH de rata. Más específicamente, las muestras de piel humana se obtuvieron de pacientes que padecen dermatitis atópica en la Universidad Médica de Tokio tras obtener el consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por "Tokyo Medical University Institutional Review Board" y "Shideido Special Subcommittee" en relación con la ética humana.

Se incubaron las secciones de dermatitis atópica humana (piel afectada y piel no afectada) y la piel normal durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti BH de rata e IgG anti filagrina humana, seguido de lavado con PBS y posterior incubación con un anticuerpo secundario unido a un fluorescente en la forma de Alexa Fluor 555 o 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Se utilizó DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, de Molecular Probes) para visualizar el núcleo.

Los resultados de la tinción de tejidos de piel normal se muestran en la figura 8, mientras que los resultados de la comparación de la piel de un sujeto sano (piel normal) y la piel de un paciente con dermatitis atópica (zona de la erupción atópica) se muestran en la figura 9. Como se muestra en la figura 8, se demostró que la bleomicina hidrolasa se expresaba mucho en la capa superior de la epidermis y se localizaba de la misma manera que la filagrina. Por otro lado, en las zonas de erupción atópica, la expresión de la bleomicina hidrolasa y de la filagrina era baja en comparación con la piel normal (Fig. 9).

PCR cuantitativa

El nivel de expresión de la bleomicina hidrolasa en los queratinocitos se midió por PCR cuantitativa usando el método descrito a continuación. La medida se llevó a cabo utilizando el Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), mientras que se utilizó el Light Cycler FastStart DNA Master CYBR Green I para el reactivo. Se añadieron alícuotas de 0,6 μl de cada uno de cebadores de la bleomicina hidrolasa y 6,8 μl de agua a 10 μl de mezcla maestra de SYBR Green I para llegar a un volumen total de 20 μl seguido de llevar a cabo 45 ciclos de PCR consistentes en 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C. Los resultados obtenidos se corrigieron mediante la comparación con los resultados para un gen constitutivo en forma de G3PDH.

Cebador directo: TGTGGTTTGGCTGTGATGTT (SEQ ID NO. 1).

Cebador inverso: GCACCATCCTGATCATCCTT (SEQ ID NO. 2).

Los resultados de la PCR cuantitativa anteriormente mencionada se presentan en la figura 10. Como se muestra en la figura 10, la bleomicina hidrolasa se expresó más en los queratinocitos que habían alcanzado la confluencia, es decir los queratinocitos diferenciados, en comparación con los queratinocitos con 80% de confluencia, es decir los queratinocitos no diferenciados. En otras palabras, en base a los resultados de este experimento, se determinó que esta enzima no se expresa a niveles altos en células basales antes de la diferenciación. Los resultados de esta PCR cuantitativa apoyan los resultados obtenidos en la tinción de tejidos antes mencionada.

Experimento 5

1) Ensayo de luciferasa de promotores de BH usando queratinocitos epidérmicos humanos

Se añadió un amortiguador de lisis (200 μl) a los queratinocitos en fase proliferativa (aprox. 80% de confluencia) o a los queratinocitos diferenciados (tras alcanzar la confluencia, se exponen al aire y se añade calcio 2 mM continuándose el cultivo durante 2 días) para lisar las células. Se utilizó el sistema de ensayo de luciferasa Bright-

Glo (Promega Co., Madison, WI, USA) para la medición. Se transfirieron 20 µl de muestra a un tubo determinado seguido de la medición utilizando Auto Lumat Plus (LP9538, Berthold GmbH & Co., KG, Bad Wildbad, Germany). Según los resultados mostrados en la figura 12, se determinó que con el fin de expresar la bleomicina hidrolasa, la región reguladora de la transcripción mencionada anteriormente debe tener una región que se extiende al menos 216 pb aguas abajo de la secuencia que codifica la enzima.

2) La irradiación UV de NHEK

Se recogió el ARN por un método determinado a las 3 horas, 24 horas y 48 horas posteriores a la irradiación con UVB a 30 mJ o 60 mJ (Torex F120S-E-30/DMR, 20 W, Toshiba Medical Supply), y se midieron los niveles de expresión del ARNm de la bleomicina hidrolasa y de la calpaína por PCR cuantitativa. Como resultado, la muestra recogida 48 horas después de irradiar a 30 mJ expresó el nivel más alto de bleomicina hidrolasa (Figura 13).

3) Efecto de citoquinas en la expresión de Bleomicina

Se añadieron IL-4 (concentración final: 0,1, 1,0 o 10 ng/ml), TNF-α (concentración final: 0,1, 1,0 o 10 ng/ml) e IFN-γ (concentración final: 1,0, 10 o 100 ng/ml) respectivamente a queratinocitos cultivados en fase proliferativa, y tras incubación durante 24 horas, se recogió el ARN utilizando Isogen. La expresión del ARNm de la bleomicina hidrolasa se midió por PCR cuantitativa. Los resultados se muestran en la figura 14. Según los resultados mostrados en la figura 14, se determinó que la interleucina-4 (IL-4), que es un tipo de citoquina Th2, regula a la baja la expresión de la bleomicina hidrolasa.

Experimento 6 (IRF-1/2 se muestran por razones de comparación)

Caracterización del gen de BH humana

1) Clonación de la región flanqueante 5' de BH

Se amplificó la región flanqueante 5' de BH según la secuencia de nucleótidos del gen de BH humana utilizando el kit Genome Walker (Clontech, Mountain View, CA) según el protocolo del fabricante usando un cebador específico del gen 1 (GSP1) que tiene la secuencia 5'-tctctgagctgtatcagagcagctaca-3' (SEQ ID NO 3) y un cebador específico del gen 2 (GSP) que tiene la secuencia 5'-tgaacacgcgctccgagctgctctatggcg-3' (SEQ ID NO. 4). En resumen, la PCR primaria se llevó a cabo utilizando Ex Taq ADN polimerasa (Takara, Shiga, Japan) en presencia de 5% de dimetilsulfóxido usando GSP1 y un cebador adaptador (AP) 1 y utilizando un protocolo de PCR de dos etapas recomendado por el fabricante que consiste en 7 ciclos de 25 segundos a 94°C y 4 minutos a 72°C seguido de 32 ciclos de 25 segundos a 94°C y 4 minutos a 67°C, y finalmente elongación durante 4 minutos a 67°C. A continuación, la mezcla de la PCR primaria se diluyó y se usó como molde de la amplificación de PCR secundaria usando GSP2 y AP2. La PCR secundaria se llevó a cabo de la misma manera que la PCR primaria con la excepción de que se usan 5 ciclos en lugar de 7 ciclos para el número de ciclos iniciales y se usan 20 ciclos en lugar de 32 ciclos para el número de ciclos posteriores. Se produjeron mutantes de delección 5' continuos de la región flanqueante 5' de BH por PCR utilizando los cebadores mostrados en la figura 15. Después de la amplificación, todos los productos de PCR se clonaron en un Vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) seguido por la determinación de la secuencia utilizando el ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Con el fin de construir un plásmido reportero pGL3-1216/+1, se llevó a cabo la PCR bajo las condiciones de 30 ciclos de desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C, 30 segundos a 94°C y 1 minuto a 72°C seguida de elongación final durante 4 minutos a 72°C usando como plantillas pGEM-T-1216/+1 junto con un par de cebadores específicos de BH (5'-ccgggtaccatcagagttccttagaa-3' (SEQ ID NO. 5) y 5'-taaatcgcggtggcggccacgctgccc-3' (SEQ ID NO. 6) que contiene los sitios de restricción KpnI y MluI. La mezcla de PCR resultante se digirió con KpnI y MluI y se clonó en el vector pGL3-Basic (Promega). Además, el vector pGL3-Basic contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga. Todas las construcciones se prepararon usando el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen, Dusseldorf, Germany).

2) Mutagénesis dirigida

La mutagénesis de los sitios de unión MZF-1, Sp-1 y IRF-1/2 se llevó a cabo mediante el kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) según el protocolo del fabricante. Se utilizaron los cebadores que consisten en 5'-ggaccccgcttcagcctccccgcc-3' (SEQ ID NO.7) (cebador directo del sitio Sp-1 mutante) y 5'-ggcggggaggctgaaacgggggtcc-3' (SEQ ID NO. 8) (cebador inverso del sitio Sp-1 mutante) para producir una mutación por delección en Sp-1. Se utilizaron los cebadores que consisten en 5'-gactcagcaacgcggtttgtccctccgc-3' (SEQ ID NO. 9) (cebador directo del sitio MZF-1 mutante) y 5'-gcgaggggacaaaaccggttgctgagtc-3' (SEQ ID NO. 10) (cebador inverso del sitio MZF-1 mutante) para el MZF-1 mutante. Se utilizaron los cebadores que consisten en 5'-gccgagcctccggcgtcc-3' (SEQ ID NO. 11) (cebador directo del sitio IRF-1/2 mutante) y 5'-ggagcggcggaggctcggcggc-3' (SEQ ID NO. 12) (cebador inverso del sitio IRF-1/2 mutante) para el IRF-1/2 mutante.

3) Transfección y medición de la actividad del promotor

Los queratinocitos se cultivaron en una placa de cultivo tisular de 12 pocillos con una densidad de 5×10^4 células/pocillo, y se transfectaron usando el reactivo de transfección FuGene HD (Roche Diagnostics, Basel,

Switzerland) y alícuotas de 1 µg de cada construcción. Todas las células se transfectaron simultáneamente con el vector pGL4.74 [hRluc-TK] (Promega) que contiene luciferasa de Pensamiento del Mar (Renilla) bajo el control de un promotor de HSV-TK con el propósito de corregir la eficacia de la transfección. A menos que específicamente se indique lo contrario, las células se recogieron 24 horas después de la transfección y se lisaron utilizando el amortiguador de lisis pasiva (Promega) a 250 µl por pocillo. La actividad de luciferasa se analizó mediante el sistema Dual Luciferase Report Assay (Promega) y el luminómetro Autolumat Plus (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Se normalizó la actividad de la luciferasa de luciérnaga en base a la actividad de la luciferasa de Pensamiento del Mar. Se llevaron a cabo tres procedimientos de transfección de forma independiente en cada construcción, y los resultados fueron representados en forma de un valor promedio.

5
10 4) Análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se analizaron los niveles de transcripción de BH y factores relacionados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN total se extrajo a partir de células cultivadas utilizando Isogen (Nippon Gene, Tokio, Japan) según el protocolo del fabricante. El ARN total se transcribió de forma inversa a ADNc utilizando SuperScript™ II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real con el sistema LightCycler Raid Cyler usando el LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) según el protocolo del fabricante. La información relativa a los cebadores utilizados se muestra en la figura 16. Se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia. La especificidad de los fragmentos amplificados se confirmó por medio del análisis cuantitativo de las curvas de fusión utilizando el software de análisis LightCycler. Se normalizaron las cantidades de ARNm en base al ARNm de GAPDH y, finalmente se indicó como porcentaje del ARNm de un control no tratado.

20 5) Inhibición de IRF-1 e IRF-2 basada en ARNsi

Los queratinocitos cultivados se transfectaron utilizando Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 40 nM de IRF-1ip, IRF-2ip y siCONTROL A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) según el protocolo del fabricante. Posteriormente las células fueron cultivadas durante 24 horas en un medio sin anticuerpos, seguido de la extracción del ARN total y el análisis por RT-PCR en tiempo real en la forma descrita anteriormente.

25 6) Análisis del cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Se prepararon las sondas bicatenarias de los oligonucleótidos por alineamiento de los oligonucleótidos monocatenarios biotinilados con los oligonucleótidos no marcados monocatenarios (Figura 17). Se llevó a cabo la extracción nuclear y EMSA usando un kit de extracción nuclear y el kit EMSA Gel Shift (Panomics, Santa Clara, CA). Los extractos nucleares (4 µg) se incubaron durante 30 minutos a 15°C con 1x amortiguador de unión, 1 µg de Poly[d (IC)] y sondas biotiniladas (50 pmol) que corresponden a los sitios de unión MZF-1, Sp-1, IRF -1/2 y GATA-1. Con el fin de llevar a cabo un ensayo competitivo, se añadió el doble de la cantidad de sonda no marcada a la reacción de unión antes de añadir las sondas biotiniladas. Estas mezclas de incubación fueron entonces sometidas a electroforesis con 0,5x de amortiguador TBE en 8% de gel de poliacrilamida seguido por transferencia a una membrana de nylon Biotodyne B (Pall, Port Washington, NY). Las bandas se visualizaron usando el kit de detección de quimioluminiscencia proporcionado en el Kit de EMSA Gel Shift.

35 7) Resultados

Aislamiento y caracterización de los promotores del gen de BH humano

Se ha determinado que un gran número de sitios de unión del factor de transcripción putativo están presentes dentro de la región flanqueante 5' de la BH humana según los resultados de una búsqueda usando el programa Genome Net MOTIF (Figura 18A). En particular, puesto que las secuencias que muestran una estrecha coincidencia con las secuencias de consenso reconocidas por MZF-1, Sp-1, IRF-1/2 y GATA-1/2 están presentes en una región que se extiende desde -216 hasta 1 próxima a la localización de los lugares de iniciación de la transcripción, se sugirió que estos factores de transcripción están involucrados en la regulación de la actividad del promotor de BH. Más precisamente, se llevó a cabo un análisis de delección para determinar las regiones promotoras de BH (Figura 18B). El mayor nivel de actividad de luciferasa se detectó en los queratinocitos diferenciados transfectados con pGL3-816. Sin embargo, la actividad relativa de la luciferasa de los plásmidos de delección se mantuvo elevada hasta que la delección llegaba a pGL3-216. Entre las construcciones, el plásmido que contiene el fragmento que se extiende desde -444 hasta +1 (indicado como pGL3-444) demostró una actividad significativamente menor en los queratinocitos cultivados, y se sugirió que había una actividad supresora aguas arriba en la región desde -616 hasta -444. Puesto que estos resultados demostraron que la región desde -216 hasta -1 contiene el promotor mínimo para la transcripción del gen de BH, la secuencia de nucleótidos de la misma se muestra en la figura 18C. Dado que esta secuencia no contenía una caja TATA o CCAAT, se sugirió que posee propiedades constitutivas de este gen. Por otro lado, varios sitios de unión del factor de transcripción, tales como MZF-1, Sp-1, IRF-1/2 y GATA-1/2, estaban presentes en esta región promotora.

55 Identificación del elemento de acción en cis latente implicado

Regulación del gen de BH

Se construyó una nueva serie de mutantes de delección dirigida a cada elemento de acción en cis para determinar el elemento de acción en cis latente del promotor mínimo implicado en la regulación de la transcripción de la expresión del gen de BH. La actividad promotora se vio regulada muy a la baja en el caso de la delección de los sitios de unión MZF-1, Sp-1 y el IRF-1/2 (Figura 19A).

- 5 Además, se llevó a cabo una investigación en cuanto a si estos factores de transcripción son realmente capaces de unirse a cada uno de los sitios de unión putativos o no. Por lo tanto, se llevó a cabo un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando un extracto nuclear a partir de queratinocitos cultivados junto con sondas de oligonucleótidos bicatenarias que contienen el sitio de unión MZF-1, Sp-1, GATA-1 o IRF-1/2. Como se muestra en la figura 19B, aunque Sp-1, MZF-1 y IRF-1/2 se unieron al sitio diana que corresponde al promotor BH, GATA-1/2 no se unió. Estos resultados indican que estos sitios de unión de la región promotora que se extiende desde -216 hasta -105 pb son esenciales para el elemento de acción en cis en la transcripción de BH.

Regulación mediada por citoquinas de la expresión del gen de BH

- 15 Dado que la BH es una enzima generadora de NMF, tiene el potencial de implicarse en la fisiopatología de la DA. Por consiguiente, se realizó una investigación de los efectos de las citoquinas Th1, Th2 y Th17 sobre la expresión del gen de BH. La figura 20A indica que la citoquina Th1, IFN- γ , regula a la baja la expresión del ARNm de BH de una manera dependiente de la dosis en los queratinocitos proliferativos. Por otra parte, las citoquinas Th2 y Th17 no mostraron efecto significativo alguno en la expresión de BH. Se obtuvieron resultados similares con los queratinocitos diferenciados (datos no mostrados). Se llevó a cabo un ensayo del promotor con el fin de determinar el papel de IFN- γ en la regulación de la expresión del gen de BH, y se especificaron los elementos de respuesta.

- 20 Como se muestra en la figura 20B, el IFN- γ regula a la baja la actividad del promotor de BH en los queratinocitos proliferativos transfectados con pGL3-BH-616 que contienen una secuencia de unión a IRF-1/2 entre -131 y -120. Después de la delección de esta secuencia, el IFN- γ ya no inhibía la actividad del promotor de BH (Figura 20B). Además, se inhibió la expresión génica de IRF-1 y IRF-2 usando ARN pequeño de interferencia (ARNsi) con el fin de determinar si IRF-1/2 es un mediador esencial de la regulación a la baja de la BH inducida por IFN- γ . La actividad de IFN- γ se inhibió significativamente en los queratinocitos cultivados transfectados con ARNsi de IRF-1 o de IRF-2 (40 nM) (Figura 20C). Estos resultados sugieren fuertemente que la secuencia de unión IRF-1/2 es esencial para la regulación a la baja de la expresión del gen de BH inducida por IFN- γ .

Expresión de BH y de los factores relacionados en los queratinocitos cultivados

- 30 Se analizó por PCR en tiempo real la expresión de la BH, de la calpaína-1 y de los factores de expresión putativos en las células proliferativas y diferenciadas con el fin de investigar el mecanismo de regulación de la transcripción en la epidermis. Como se muestra en la figura 21A, el ARNm de BH se reguló al alta en los queratinocitos diferenciados, como en aquellos 2 días después de la confluencia (3,6 veces) y en los cultivados a una concentración de calcio alta (8,6 veces), en comparación con los queratinocitos proliferantes. Estos resultados coinciden con los datos del ensayo de promotor (Figura 18B). También se obtuvieron resultados similares con respecto a la calpaína I (aumento en la regulación al alta de aproximadamente 2,5 veces). Además, se realizó una investigación de los vectores de expresión de diversos factores de transcripción tales como MZF-1, Sp-1, GATA-1, IRF-1 y IRF-2 en los queratinocitos proliferativos. Como se muestra en la figura 21B, estos factores de transcripción se regularon al alta en los queratinocitos diferenciados de acuerdo con la expresión de la BH. Sin embargo, la expresión del ARNm de GATA-1 fue significativamente menor en comparación con otros factores (<1/32). Se cree que GATA-1 no juega un papel importante en los queratinocitos. Por consiguiente, se sugiere que la BH se sintetiza de una manera dependiente de la diferenciación mediada por MZF-1 y Sp-1. El hecho de que IRF-1 y IRF-2 también se regulen al alta por estímulos de la diferenciación indica que la expresión de BH es extremadamente sensible a IFN- γ .

Efectos de las citoquinas Th1 y Th2 en la expresión de factores de transcripción putativos

- 45 Se realizó una investigación de la regulación dependiente de citoquinas de estos factores de transcripción. La figura 22A indica que el IFN- γ regula al alta considerablemente la expresión del ARNm de IRF-1 en una forma dependiente de la dosis. Del mismo modo, la expresión de IRF-2 se regulaba al alta en presencia de IFN- γ . En contraste, la expresión de IRF-1 y IRF-2 se incrementó significativamente sólo en presencia de IL-4 a 100 ng/ml (Figura 22B). Es interesante observar que tanto MZF-1 como Sp-1 se regulaban a la baja más eficazmente en presencia de IL-4 a 10 ng/ml (Figura 22C). Estos resultados sugieren que la expresión de BH está regulada directa e indirectamente por las citoquinas Th1 y Th2, respectivamente.

Regulación a la baja de BH en la piel con dermatitis atópica

- 55 Aunque las mutaciones con pérdida de funcionalidad de FLG están relacionadas con el mecanismo de aparición de la DA, existe la posibilidad de que no esté relacionada con una delección génica, sino más bien con un trastorno en la ruta de descomposición o patología de la DA. Por consiguiente, a continuación se realizó una investigación de la localización de la BH y de la filagrina en la piel afectada y la piel no afectada de los pacientes con DA junto con la actividad de BH en esas zonas. En la piel normal, la tinción doble con anticuerpo anti-BH y anticuerpo anti-filagrina demostró la localización simultánea de BH y filagrina en la epidermis superior, y particularmente en la capa granular,

como se indicó anteriormente (Figura 23A). A un aumento mayor, aunque se indicó claramente que la BH se localizada desde la capa granular hasta la capa córnea, la filagrina se limita a las células granulares. Por el contrario, la expresión de BH disminuyó dramáticamente en la piel afectada y en la piel no afectada de los pacientes con DA observados en este estudio (n=7). Todos estos resultados indican que, a pesar de que se detectó tinción significativa todo el tiempo, se indicó una tinción de filagrina comparativamente débil. Además de la inmunohistoquímica, la actividad de la BH se midió en los extractos de las células de la capa cornea procedentes de las muestras de "tape peeling" obtenidas de 18 pacientes con DA y de 30 voluntarios sanos. Los extractos obtenidos de la piel afectada y de la piel no afectada de los pacientes de DA mostraban una actividad de BH considerablemente inferior a la de los voluntarios sanos (27,1% y 8,8% inferior, respectivamente). (Figura 23B). Estos resultados mostraban que la BH se localiza junto a la filagrina, y que la actividad de la misma disminuye considerablemente en la piel de los pacientes que padecen DA.

Discusión

En este estudio, se examinó el mecanismo de regulación de la expresión génica de la BH mediante la clonación y caracterización funcional de la región promotora. Se identificó que una región importante para la actividad del promotor de BH estaba presente en una región situada -216 pb aguas arriba por análisis de promotor (Figura 18B). En esta región, los sitios de unión putativos MZF-1 y Sp-1 mostraron un efecto significativo sobre la actividad del promotor de BH (Figuras 18C y 19A). Es interesante resaltar que también se ha indicado que Sp-1 y MZF-1 están implicados en la regulación de PAD1 que es una enzima importante para la iniciación de la descomposición de la filagrina. El Sp-1 es un miembro típico de la familia de tipo Sp/Kruppel de las proteínas con dedos de cinc que funcionan como factores de transcripción en las células de mamífero. Se cree que está implicado en casi todos los aspectos de la actividad celular, incluyendo la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la transformación neoplásica. En la epidermis humana, Sp-1 es un factor regulador importante de los genes que participan en la diferenciación epidérmica, incluyendo la involucrina, la loricrina, la transglutaminasa, y los genes PAD1, PAD2 y PAD3. El MZF-1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia Kruppel de las proteínas con dedos de cinc, y se expresa en las células hematopoyéticas totipotentes diferenciadas y en las células madre de la médula ósea. Sin embargo, no se ha descrito la función de MZF-1 durante la regulación de la transcripción en la epidermis de mamíferos. Se ha descubierto que MZF-1, Sp-1 y BH están regulados al alta simultáneamente en los queratinocitos diferenciados en comparación con los queratinocitos proliferativos (Figura 21B), lo que indica el papel de la BH en la diferenciación en lugar de en la constitución. Estos resultados indican claramente que estos factores de transcripción funcionan como factores activación de la regulación básica de la transcripción de BH durante la diferenciación final de los queratinocitos.

Por otro lado, una investigación de los elementos de acción en cis define además los sitios de unión IRF-1/2 dentro de esta región. Se confirmó que los IRF se unen directamente a la región promotora de BH mediante el uso de EMSA (Figura 19B). La mutagénesis dirigida de esta región de unión provocó una disminución significativa en la actividad del promotor de BH (Figura 19A). En consecuencia, los factores de transcripción IRF-1/2 son muy probablemente también necesarios para la actividad del promotor mínima del gen de BH en condiciones básicas. La familia los IRF consiste en un grupo de factores de transcripción, y en la actualidad, se han identificado nueve miembros de los IRF (desde IRF-1 hasta IRF-9) en varios tipos de células y tejidos. Estas moléculas IRF juegan un papel en la defensa antiviral, en la respuesta/regulación inmunitaria y en la regulación del crecimiento celular estimulada por IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Se ha demostrado que IRF-1 y IRF-2 funcionan como agonistas y antagonistas implicados en la regulación de numerosos genes inducidos por IFN- γ . Es interesante observar que el IFN- γ disminuye notablemente la expresión del ARNm de la BH (Figuras 20A y 20B). Los análisis mutagénicos de bloqueo y de sitio dirigido confirmaron que los sitios de unión de IRF-1/2 están implicados en la inhibición de la expresión de BH mediada por IFN- γ (Figuras 20B y 20C). Estos resultados indican claramente que IRF-1/2 son mediadores de la regulación a la baja del gen de BH mediada por IFN- γ en los queratinocitos humanos. Por otra parte, las citoquinas Th2 de IL-4 e IL-13 no demostraron ninguna acción directa en absoluto durante la incubación durante 24 horas (Figura 20A). Sin embargo, estas citoquinas Th2 inhibieron significativamente la expresión de moléculas activadoras en forma de MZF-1 y Sp-1. En consecuencia, es razonable pensar que las citoquinas Th2 regulan a la baja la expresión de BH.

Además, se ha demostrado que la BH está drásticamente regulada a la baja en la piel de DA afectada y no afectada (Figuras 23A y 23B). Aunque la mutación de la filagrina es un factor de riesgo primario para enfermedades relacionadas con trastornos de barrera tales como la DA, los análisis de la mutación indicaron que esta mutación es responsable de menos del 50% de las incidencias de estas enfermedades en Irlanda y de no más del 20% de las incidencias en Japón. Existe la hipótesis de que la síntesis defectuosa de filagrina así como los trastornos asociados con la descomposición de la filagrina están implicados en una ruptura de la función de barrera. Está claro que la disminución de los niveles de NMF produce la piel seca, y que esto provoca una ruptura de la barrera de la piel. La DA es bien conocida por ser una enfermedad polarizada en Th2. Sin embargo, los informes recientes sugieren que las citoquinas Th1 también desempeñan un papel en la DA. Por ejemplo, la "DA intrínseca" se caracteriza inmunológicamente por bajos niveles de expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 y un alto nivel de expresión de IFN- γ . Además, se produce un cambio de Th1 a Th2 durante una transición de la fase aguda a la fase crónica de la piel de DA. Estos resultados también indican la posibilidad de que el IFN- γ pueda jugar un papel más importante de lo que se pensaba anteriormente.

5 En conclusión, estos resultados indican que la transcripción de la BH en la epidermis humana está regulada por dos modos de regulación. La primera ruta está bajo el control de la diferenciación de final los queratinocitos, mientras que la otra ruta es dependiente de las citoquinas Th1 y Th2. Dado estas rutas están relacionadas entre sí, es probable que el equilibrio entre ellas cambie fácilmente hacia la regulación a la baja de la expresión de BH. Dado que una disminución de la BH provoca una escasez de NMF, esta conduce a la piel seca y finalmente a una posterior ruptura de la función de barrera como respuesta a la misma. Estos resultados aportan nuevas conclusiones en relación con la regulación de BH y el mecanismo de aparición de la DA.

Listado de secuencias

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

5 <120> Método de selección de agentes que mejoran la piel seca atópica empleando la actividad de bleomicina hidrolasa como indicador

<130> Y697-PCT

10 <150> JP2009-275909
<151> 2009-12-03

<160> 12

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G3PDH Cebador directo

25 <400> 1

tgtggttg ctgtgatgtt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> G3PDH Cebador inverso

<400> 2

40 gcaccatcct gatcatcctt 20

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 1 específico del gen BG

50 <400> 3

tccctcgagt ctgtatcaga gcagctaca 29

<210> 4

55 <211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Cebador 2 específico del gen BH

<400> 4

65 tgaacacgcg tccgagctgc tcatggcg 28

<210> 5

ES 2 541 614 T3

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador específico de BH que contiene Kpn 1
 <400> 5

10 ccgggtacca tcagagtcc ttagaa 26
 <210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador específico de BH que contiene Mlu 1

20 <400> 6
 taaatacgcg ttggcgccca cgctgccg 28
 <210> 7
 25 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador directo para el sitio Sp-1
 <400> 7

35 ggaccccggt tcagcctccc cgcc 24
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador inverso para el sitio Sp-1
 <400> 8

45 gccggggagg ctgaaacggg gtcc 24
 <210> 9
 <211> 29
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para el sitio MZF-1
 55 <400> 9
 gactcagcaa cgcggtttg tcctccgc 29

60 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Cebador inverso para el sitio MZF-1

ES 2 541 614 T3

<400> 10
5 gcgaggac aaaaccgct tgctgagtc 30
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Cebador directo para el sitio IRF-1/2
15 <400> 11
gccgccgagc ctccggcgct cc 22
<210> 12
<211> 22
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso para el sitio IRF-1/2
25 <400> 12
ggagcggcgg aggctcggcg gc 22
30

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para seleccionar y evaluar mejoradores de la piel seca causada por la dermatitis atópica que se lleva a cabo en células cultivadas, que comprende: evaluar un fármaco candidato como un mejorador de la piel seca causada por la dermatitis atópica en el caso de que el fármaco candidato aumente significativamente la expresión y/o la actividad de la bleomicina hidrolasa en comparación con un fármaco de control, donde la expresión y/o la actividad de la bleomicina hidrolasa se considera que ha aumentado significativamente en el caso de que la actividad de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa ha aumentado significativamente en comparación con la de un control, y donde la actividad de la transcripción se considera que ha aumentado significativamente en el caso de que la actividad de unión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1 y/o GATA-1 a la región reguladora de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa ha aumentado significativamente en comparación con la de un control.
2. Un método ex vivo para diagnosticar la predisposición a la piel seca causada por la dermatitis atópica, que comprende determinar una tendencia a la piel seca causada por la dermatitis atópica en caso de que la expresión y/o la actividad de la bleomicina hidrolasa en el tejido de la piel disminuya significativamente en comparación con la de la piel de control, al tiempo que se determina la ausencia de una tendencia a la piel seca causada por la dermatitis atópica si esta es igual o mayor que la de la piel de control, de manera que se considera que la expresión y/o la actividad ha disminuido significativamente en el caso de que la actividad de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa ha disminuido significativamente en comparación con la de un control, y de tal manera que la actividad de la transcripción se considera que ha disminuido significativamente en el caso de que la actividad de unión de los factores de transcripción MZF-1, Sp-1 y/o GATA-1 a la región reguladora de la transcripción de un gen que codifica la bleomicina hidrolasa ha disminuido significativamente en comparación con la de un control.

Fig.1

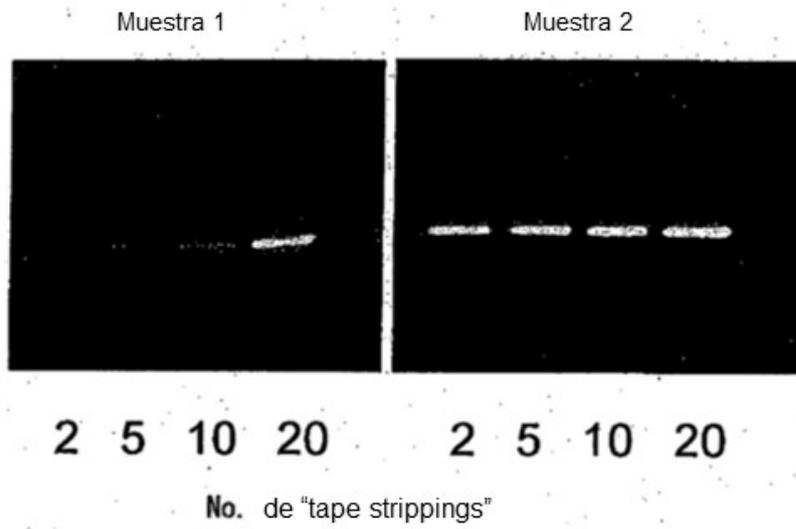
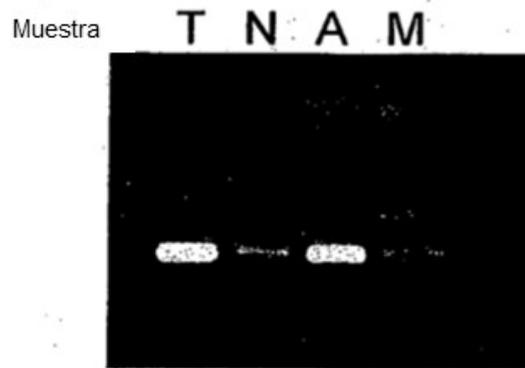


Fig.2



T A: Piel seca no perceptible
N: Un poco seca, M: Seca

Fig.3

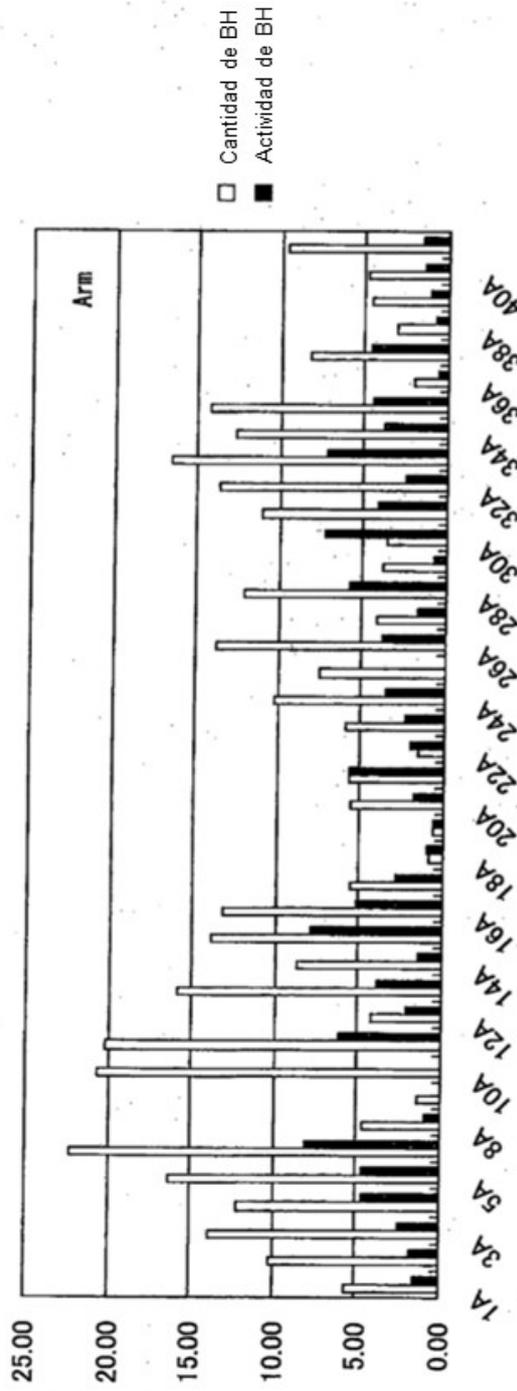


Fig.4

$$y = 0.2264x + 0.9652$$
$$R^2 = 0.3294$$

Peason: $r=0.574$

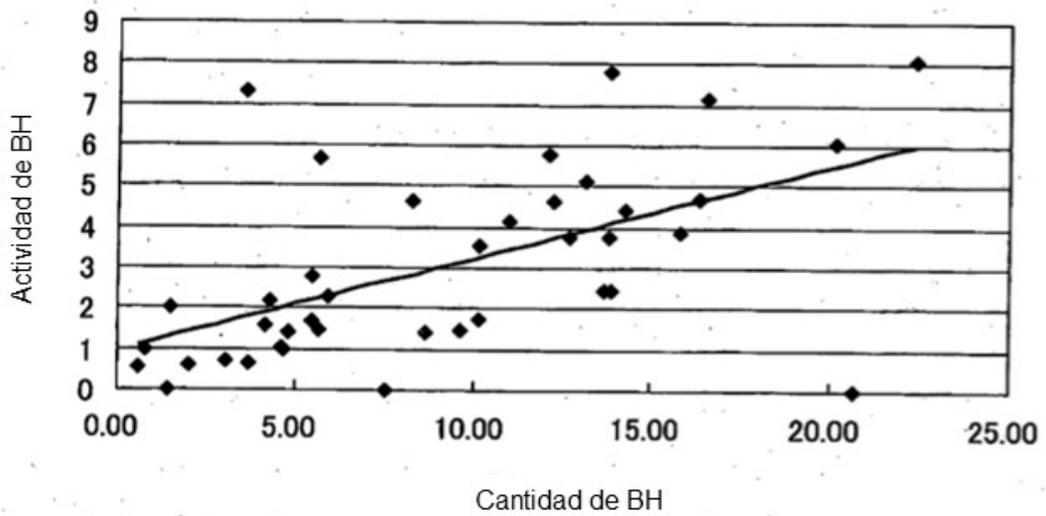


Fig.5

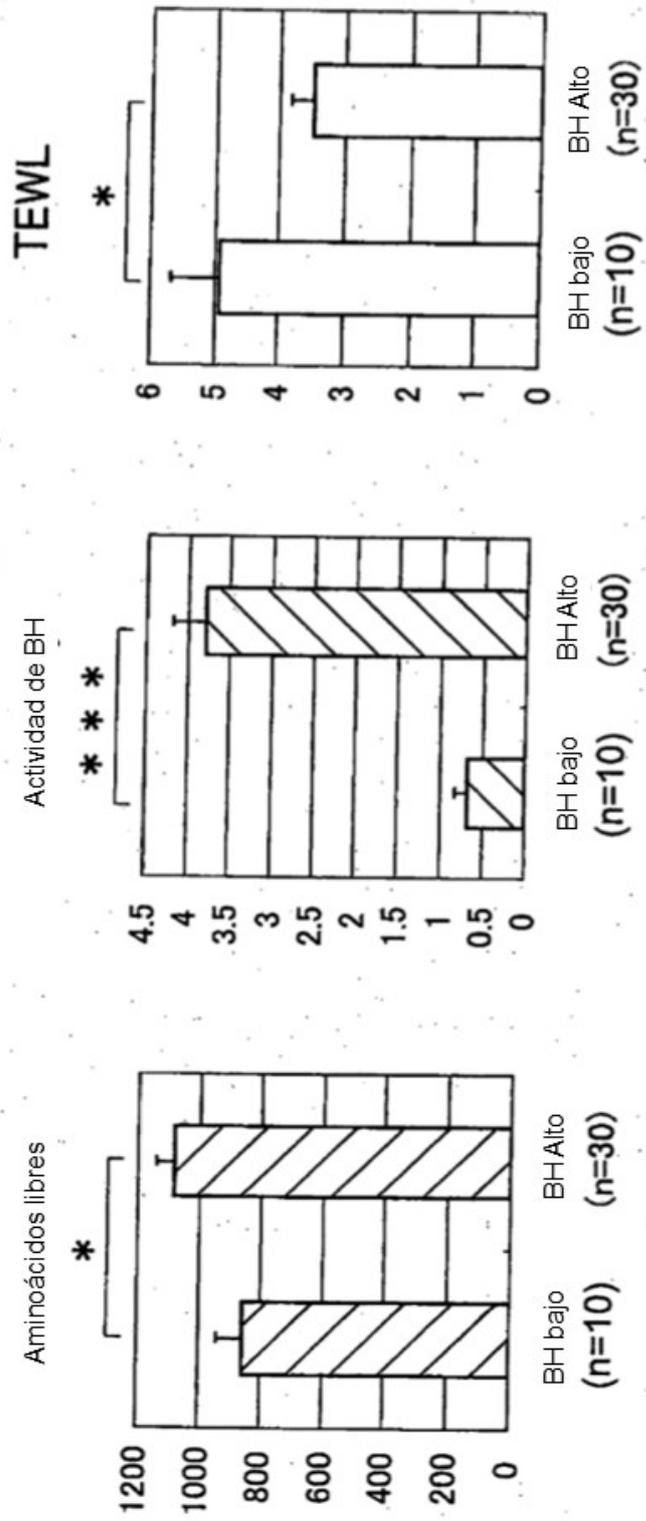


Fig.6

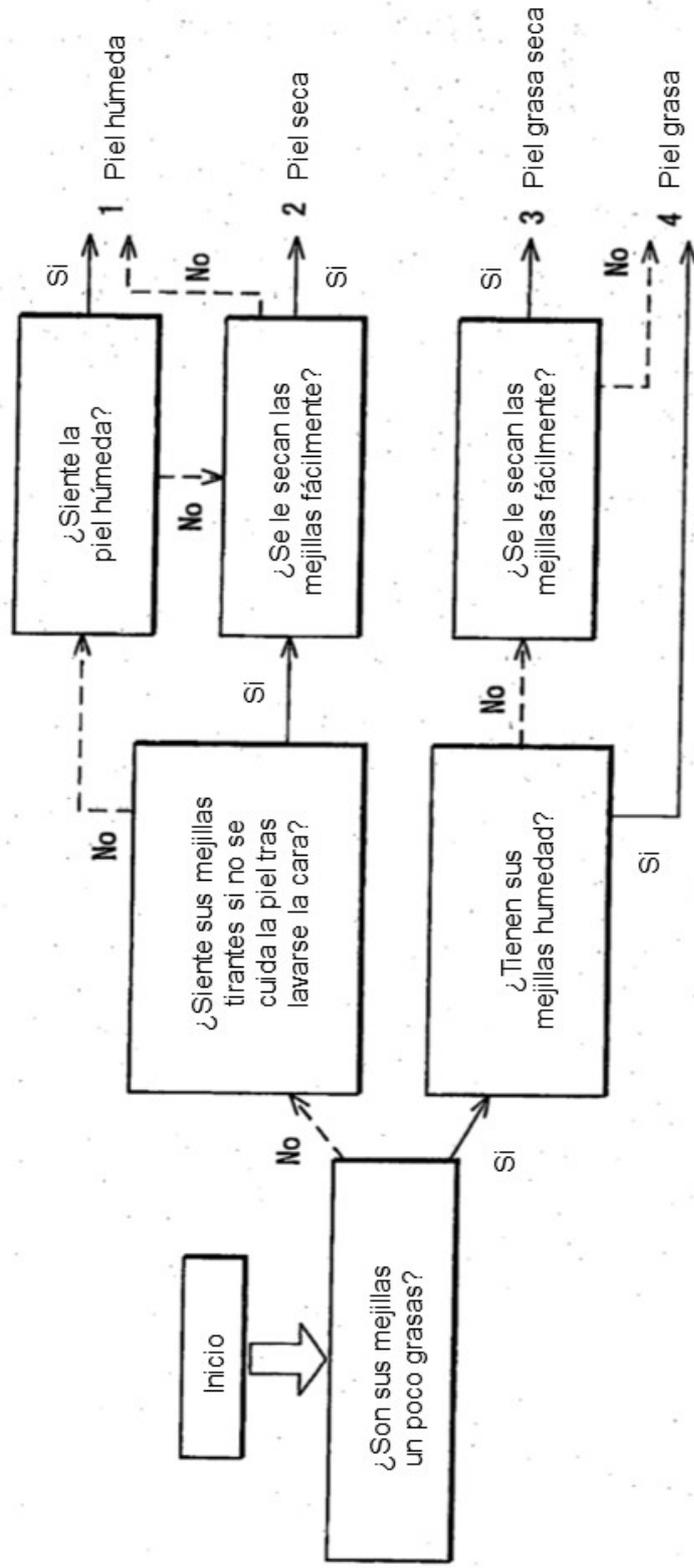


Fig.7

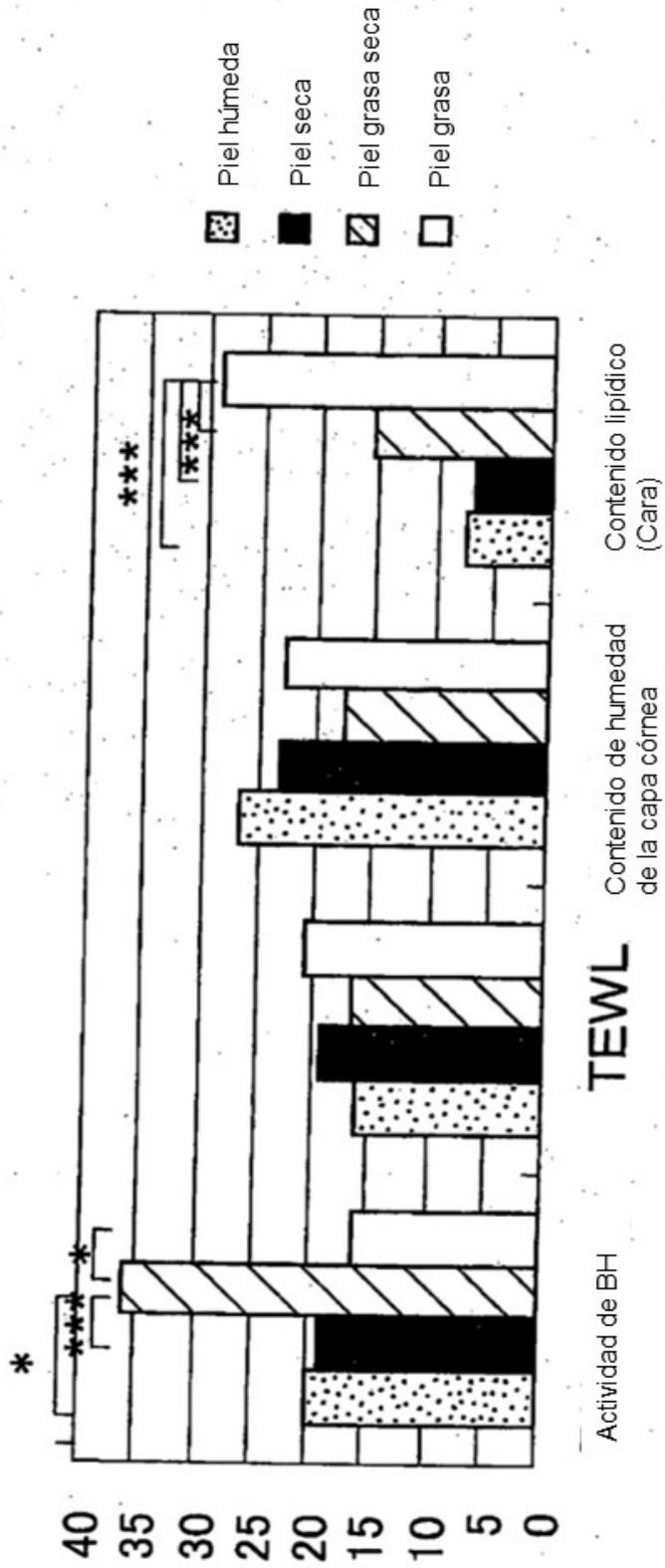


Fig.8

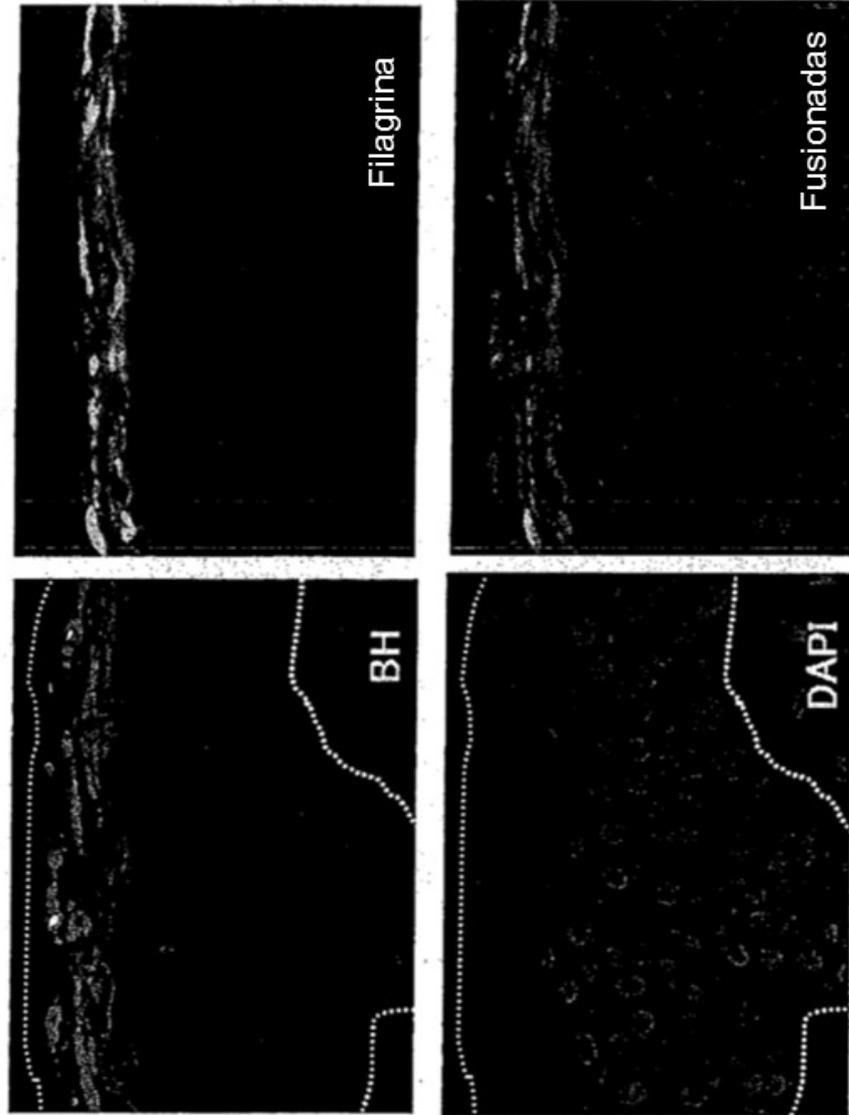


Fig.9

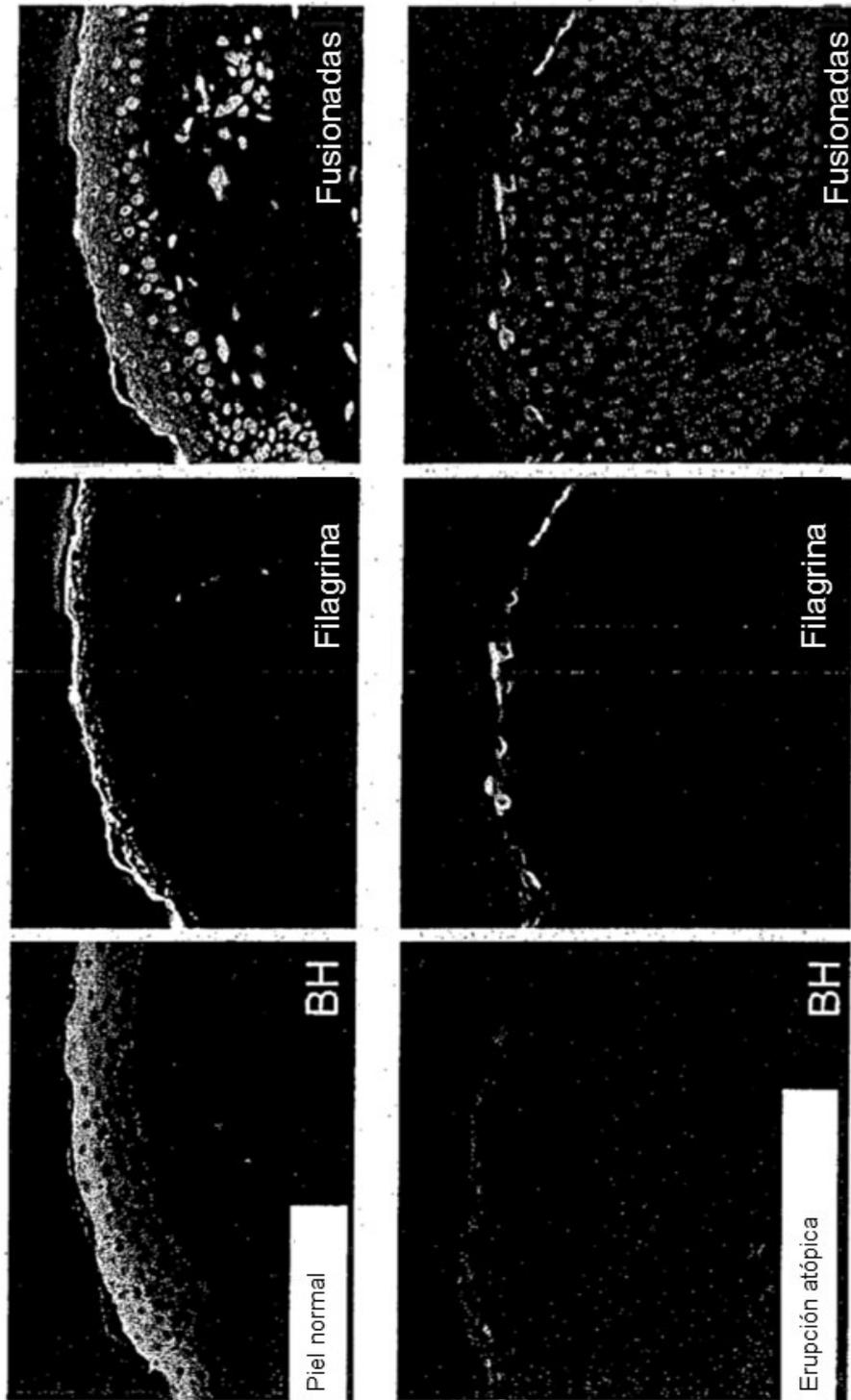


Fig.10

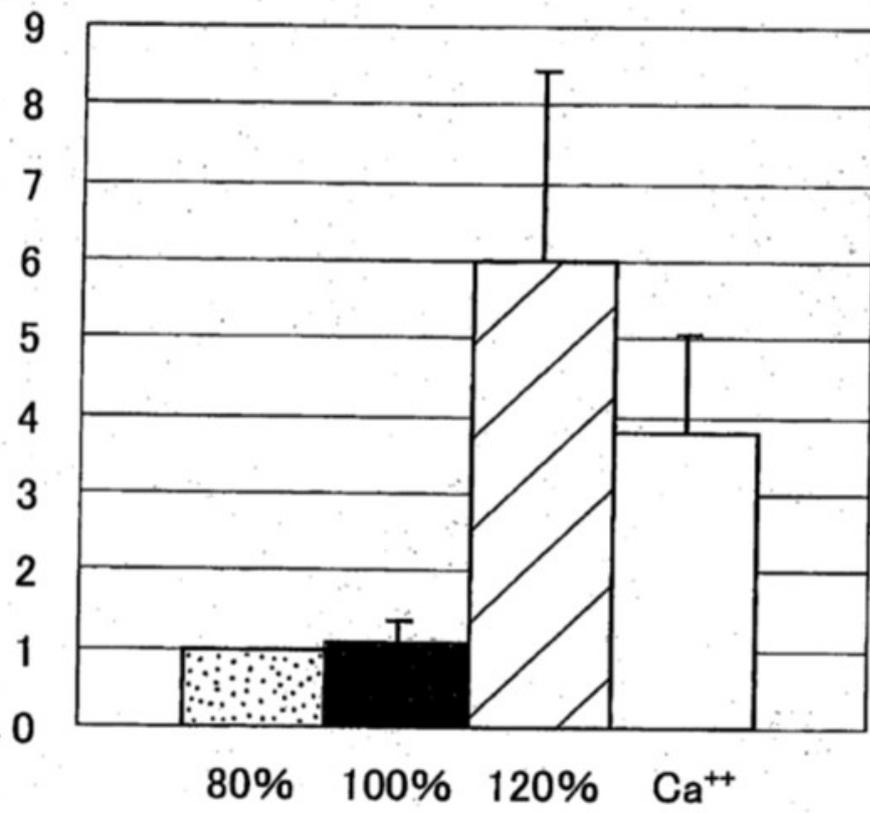


Fig.11

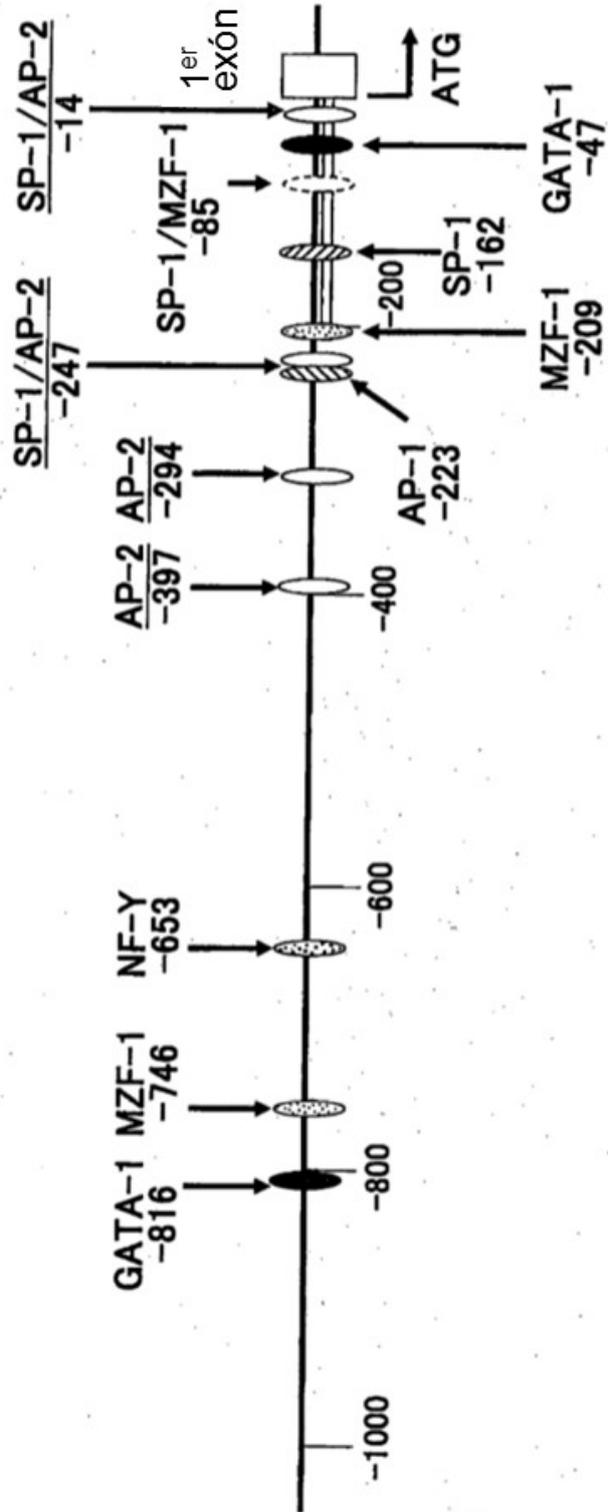
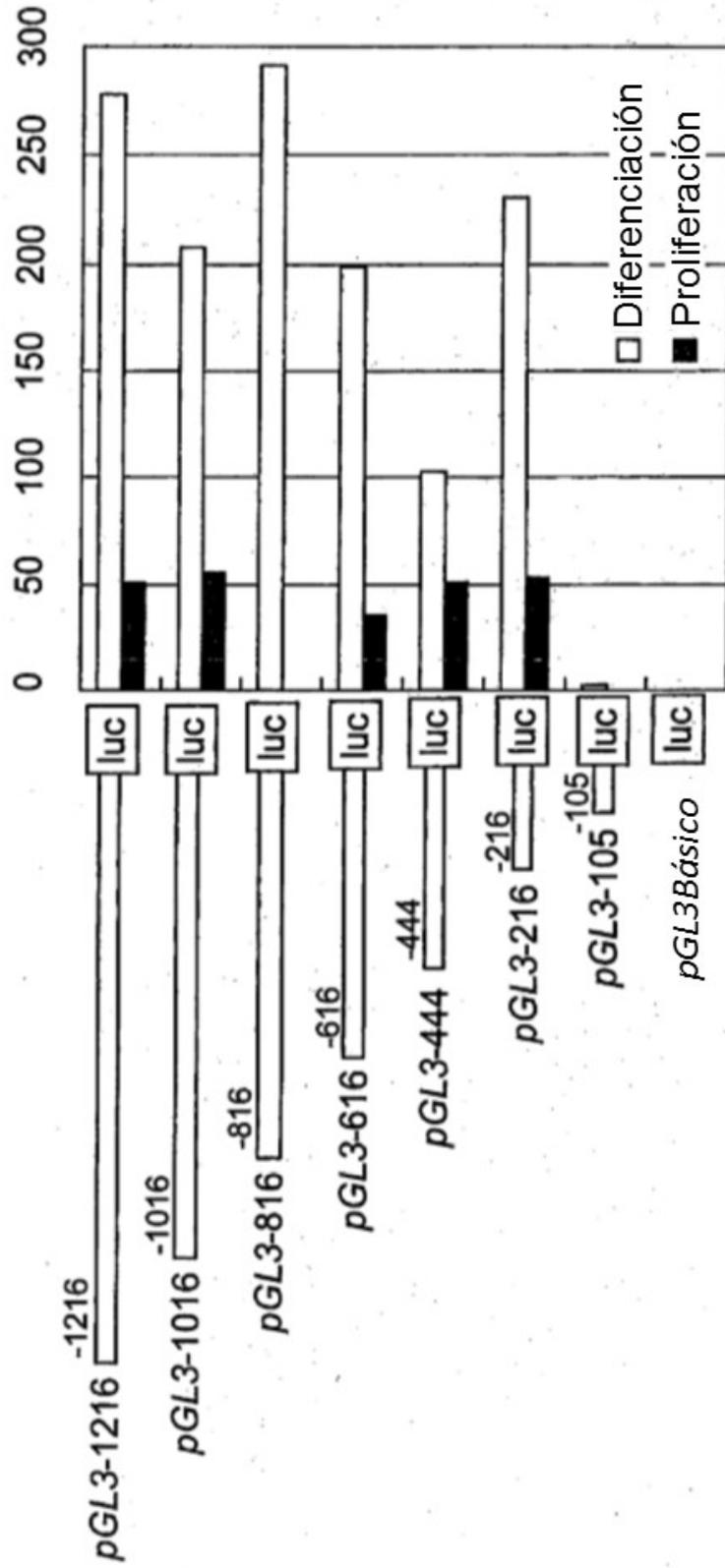


Fig.12



Ensayo de luciferasa de BH: Valor corregido

Fig.13

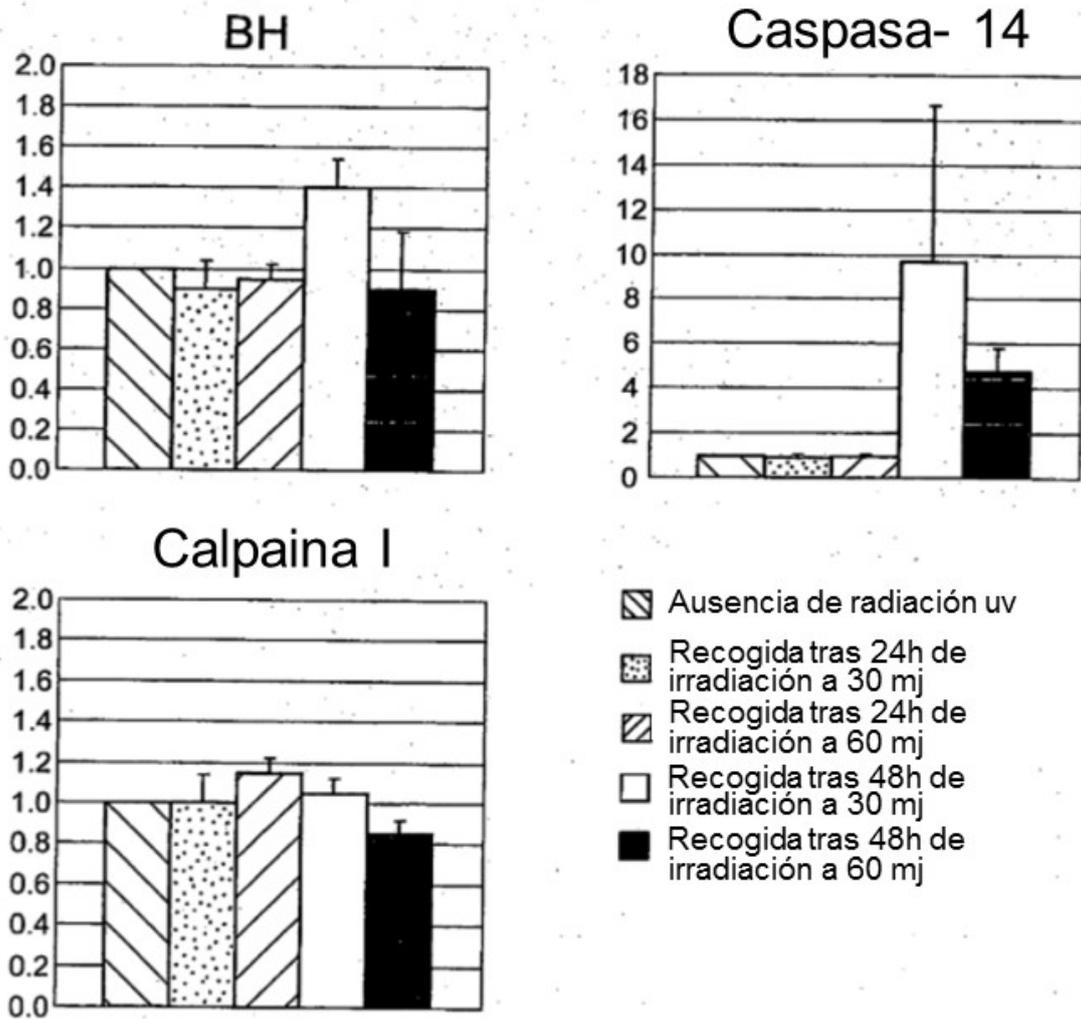


Fig.14

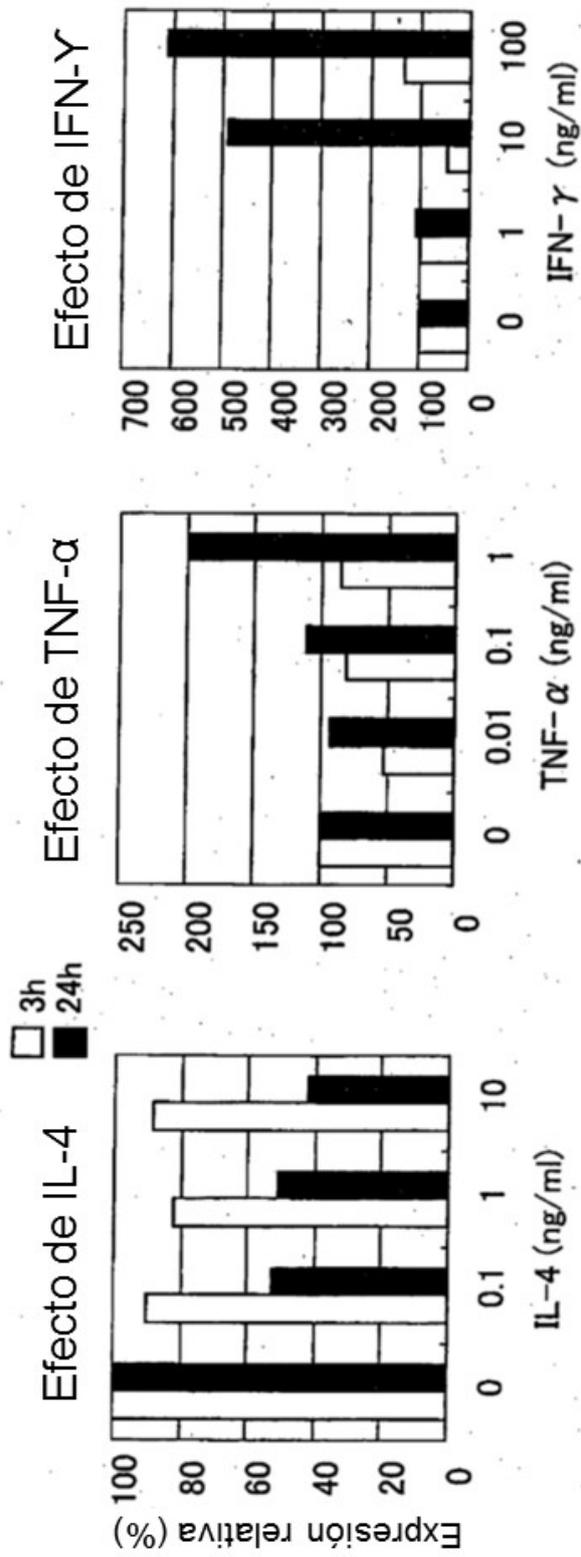


Fig.15

Nombre	Secuencia
BH-1216 KpnI (forward)	5' -CCGGGTACCATCAGAGTTCCTTAGAA-3'
BH-1016 KpnI (forward)	5' -CCGGGTACCCAAGGTTTTTACAATCT-3'
BH-816 KpnI (forward)	5' -CACGGTACCTGGGTAGTGTTCTTGAA - 3'
BH-616 KpnI (forward)	5' -CGAGGTACCTCCTTGTGACATATCGA - 3'
BH-444 KpnI (forward)	5' -AATGGTACCTTGGAGCGGGCCTGA - 3'
BH-216 KpnI (forward)	5' -AATGGTACCAGGGGGGAGTTTTGTCC - 3'
BH-171 KpnI (forward)	5' -AATGAAGGTACCTCAGCCTCCCCGCCG - 3'
BH-134 KpnI (forward)	5' -ACGGGTACCAGCCGGTTTTCTTTTC - 3'
BH-105 KpnI (forward)	5' -AATGGTACCTGCGAGAGACAGGTCG - 3'
BH+1 MluI (reverse)	5' -TAAATACGCGTTGGCGCCACGCTGCCG - 3'

Fig.16

Sonda	Secuencia
Sp-1	(sense) 5'-TCT <u>CCCAGCCTCAGTCTCCCAGCCTCAG</u> -3' (anti-sense) 5'-AGAGGGT <u>CGGAGTCAGAGGGT</u> CGGAGTC-3'
MZF-1	(sense) 5'-CGCGAGGGGGGAGTTCGAGGGGGGAGTTT-3' (anti-sense) 5'-GCGCT <u>CCCCCTCAAGCTCCCCCTCAA</u> A-3'
IRF-1/2	(sense) 5'-CCGGTTTCCTTTTTCGCGTTTCCTTTTTC-3' (anti-sense) 5'-GGC <u>CAAAGGAAAAAGCGCAAAGGAAAAAG</u> -3'
GATA-1	(sense) 5'-GCAGCGCAATCCCGGCAGCGCAATCCCGGC-3' (anti-sense) 5'-CGTC <u>CGGTTAGGGCCGTCGCGTTAGGGCCG</u> -3'

Fig.17

Gen	Secuencia	Anillamiento
BH	(forward) 5'-TGTGGTTTGGCTGTGATGTT-3' (reverse) 5'-GCACCATCCTGATCATCCTT-3'	55°C
Calpain-I	(forward) 5'-ACATGGAGGCCATCACTTTC-3' (reverse) 5'-GGTCCACGTTGTTCCACTCT-3'	55°C
Sp-1	(forward) 5'-AGCGACCAAGATCACTCCAT-3' (reverse) 5'-TGGGTGACTCAATTCTGCTG-3'	58°C
MZF-1	(forward) 5'-TAGAGCCCTTGCTCACGTTT-3' (reverse) 5'-GGGCATTGTCTAGGTGGAAA-3'	58°C
IRF-1*	(forward) 5'-GAACTCCCTGCCAGATATCGAG-3' (reverse) 5'-TGCTCTTAGCATCTCGGCTGGA-3'	58°C
IRF-2*	(forward) 5'-TGGATGCATGCGGCTAGA-3' (reverse) 5'-CATCTGAAATTCGCCTTCC-3'	58°C
GATA-1	(forward) 5'-ATTGTCAGTAAACGGGCAGG-3' (reverse) 5'-TCTGAATACCATCCTTCCGC-3'	58°C

Fig.18

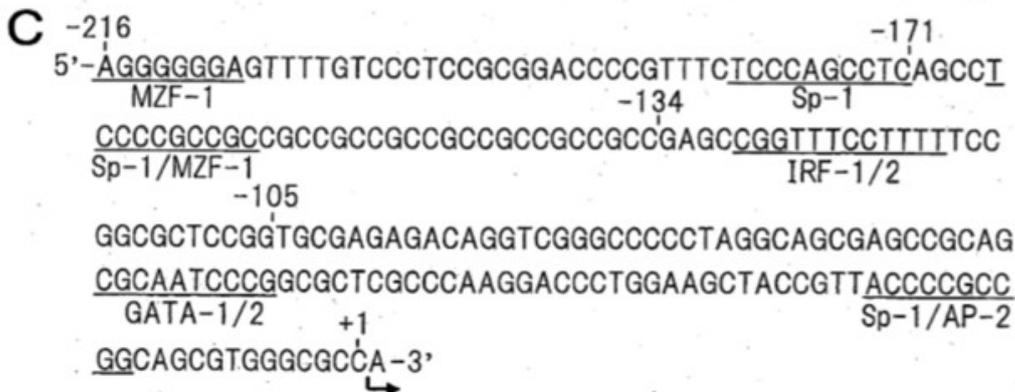
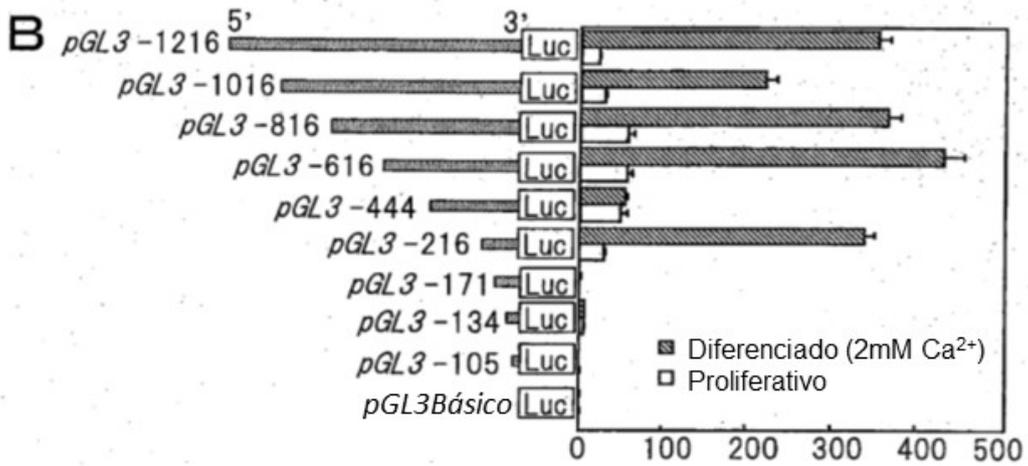
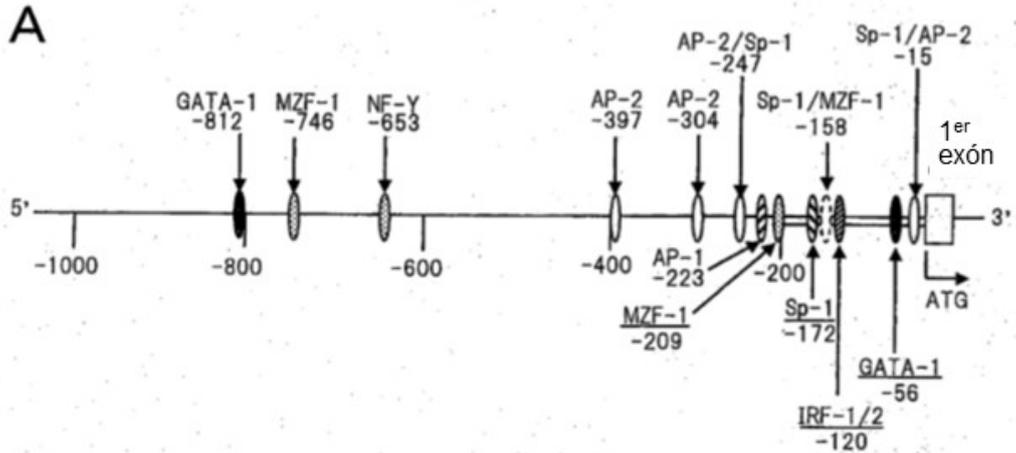


Fig. 19

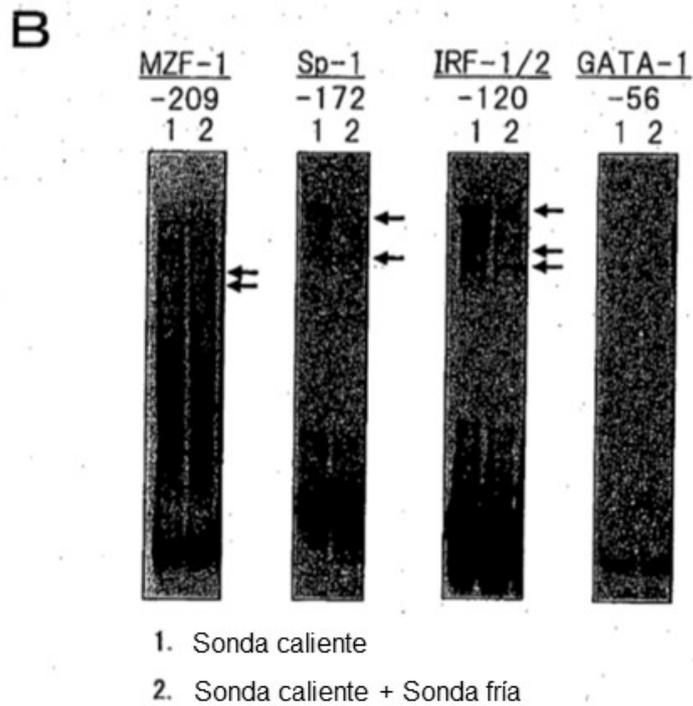
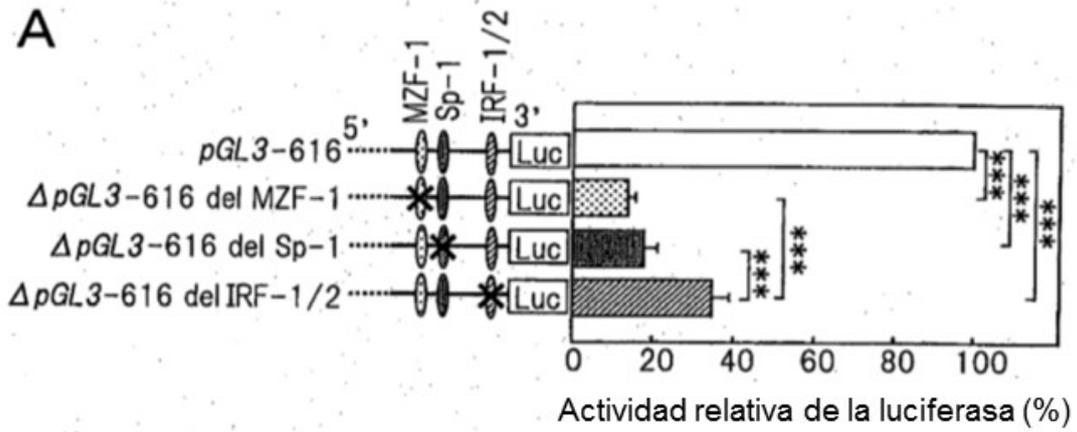
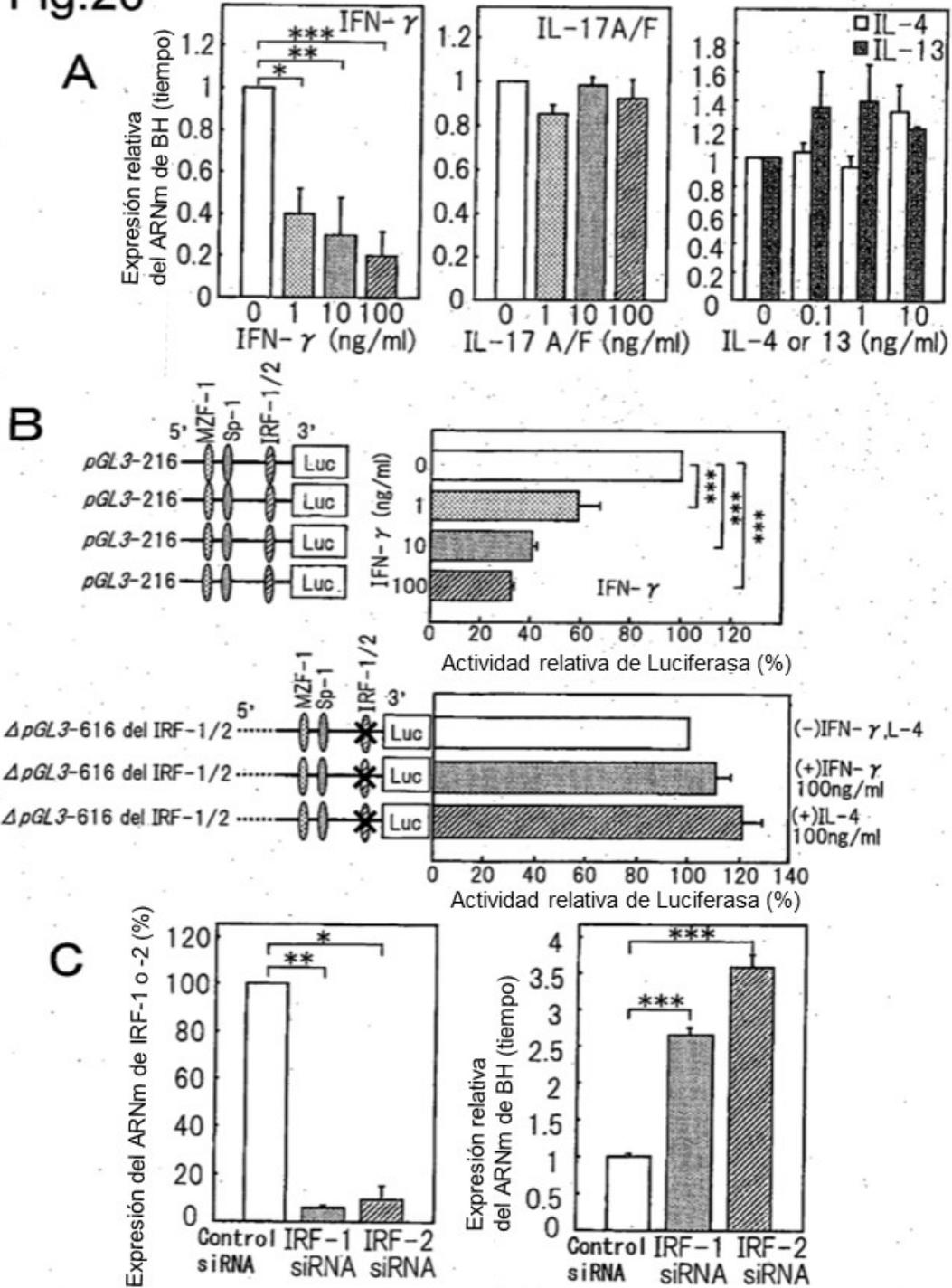


Fig.20



13/06/20

Fig.21

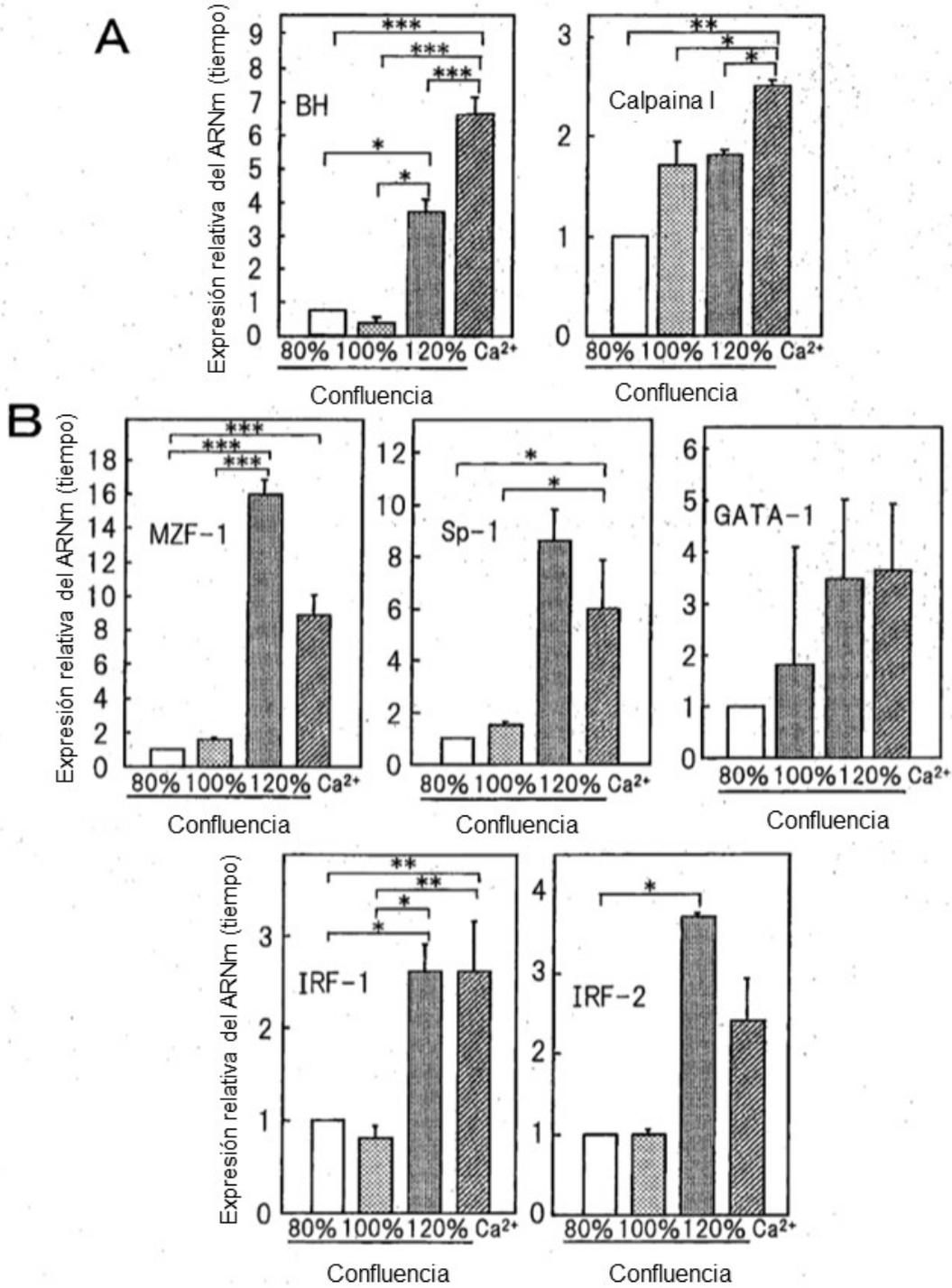


Fig.22

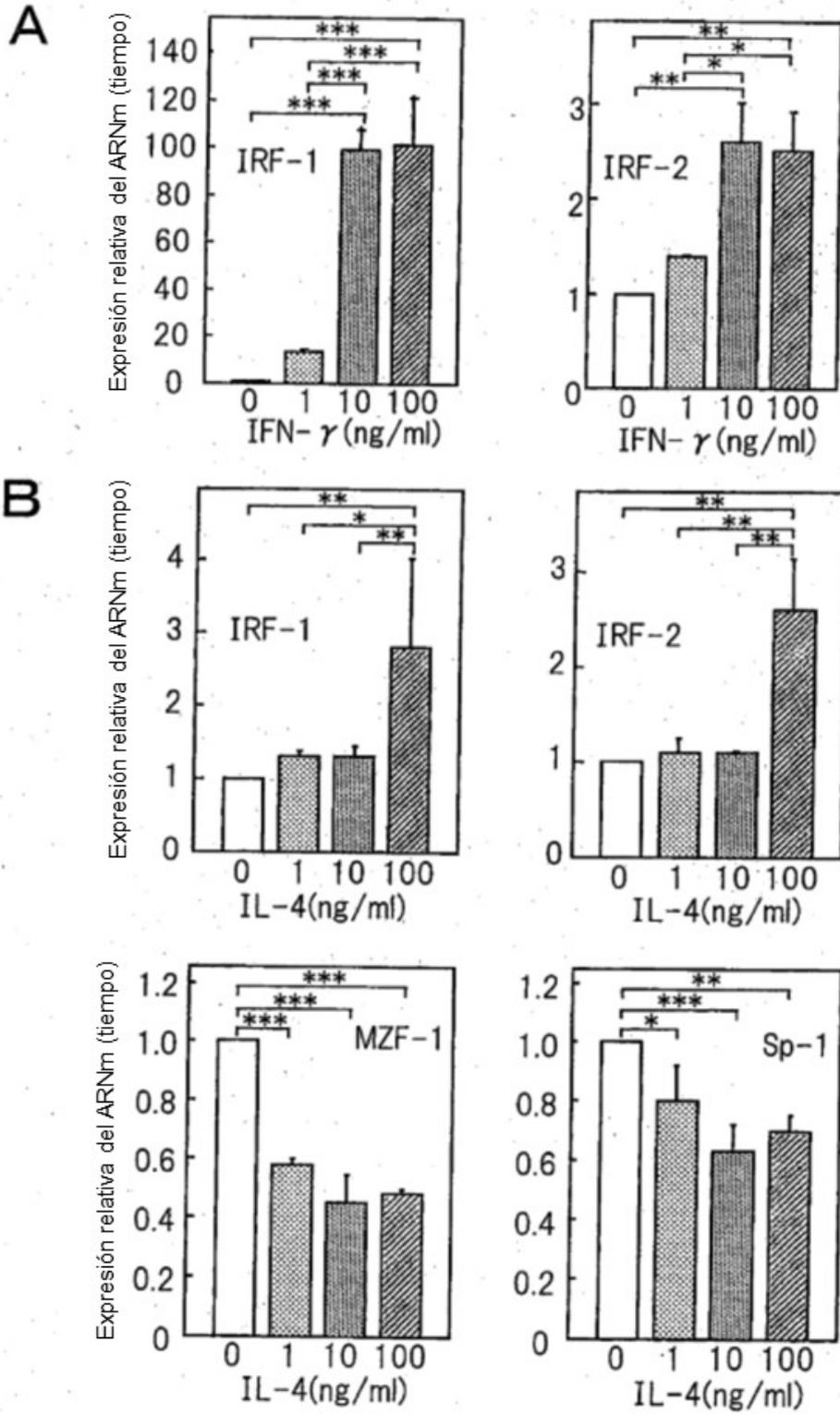


Fig.23

