

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 711**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2013 E 13702650 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2812689**

54 Título: **Procedimiento para evaluar un agente o agentes activos capaces de conservar la funcionalidad de células madre epiteliales**

30 Prioridad:

07.02.2012 FR 1251120
17.02.2012 US 201261600218 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2016

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)
14, rue Royale
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

BERNARD, BRUNO y
RATHMAN JOSSERAND, MICHELLE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 711 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

Procedimiento para evaluar un agente o agentes activos capaces de conservar la funcionalidad de células madre epiteliales

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar in vitro al menos un agente activo capaz de conservar la funcionalidad de células madre epiteliales, en particular de mantener o estimular el crecimiento y/o la densidad y/o la renovación de un material queratínico, en particular del cabello o de la piel. En particular, tal procedimiento de evaluación es de uso para seleccionar candidatos que actúan para mantener o incrementar la densidad del cabello y/o para combatir el envejecimiento de la piel.

10 Los materiales queratínicos, y en particular la cabellera y la piel, comprenden células madre epiteliales que, generalmente, además de su capacidad pluripotente, son capaces de diferenciarse en diversas células que constituyen los tejidos del cuerpo y que se autorrenuevan. Estas funcionalidades son necesarias para regenerar los tejidos, pero pueden sufrir ciertas modificaciones o disfunción con el tiempo.

15 En particular, la cabellera humana representa una colección de aproximadamente 150000 cabellos. Cada uno de ellos es generado por un componente secundario especializado de la piel, un órgano verdaderamente autónomo, el folículo capilar. El crecimiento del cabello y su renovación no es un proceso continuo, estando determinado por la actividad de los folículos capilares y el entorno de la matriz. La actividad de tales folículos es cíclica, y comprende esencialmente cuatro fases. De hecho, el folículo pasa sucesivamente desde una fase de crecimiento con producción del tallo del cabello (fase anágena) hasta una fase de involución rápida (fase catágena), después a una fase de reposo con pérdida del cabello (fase telógena), que antecede a una fase de regeneración (neógena) para una vez más llegar a la fase anágena. La fase anágena, una fase activa o de crecimiento durante la cual el cabello se hace más largo, dura varios años. La fase catágena muy corta dura unas pocas semanas. La fase telógena o fase de reposo dura unos pocos meses. Al final de este período de reposo, los cabellos se caen y vuelve a comenzar otro ciclo. Por lo tanto, la cabellera sufre una renovación constante y, de los aproximadamente 150000 cabellos que forman una cabellera, aproximadamente 10% están en reposo y serán sustituidos a lo largo de los próximos meses.

La pérdida del cabello natural se puede estimar, de media, en unos pocos centenares de cabello por día para un estado fisiológico normal. Este proceso de renovación física constante sufre un cambio natural durante el envejecimiento, haciéndose los cabellos más finos y siendo sus ciclos más cortos.

30 Sin embargo, diversas causas pueden conducir a una pérdida del cabello temporal o definitiva considerable. La pérdida del cabello, en particular la alopecia, está causada esencialmente por interrupciones de la renovación del cabello. Estas interrupciones conducen, inicialmente, al acortamiento de la fase anágena y al adelgazamiento gradual del cabello, y después a una disminución en su cantidad. Se produce la miniaturización gradual de los bulbos junto con su aislamiento a través del adelgazamiento gradual de la matriz de colágeno de la vaina conjuntiva exterior. La revascularización alrededor del folículo capilar se hace por lo tanto más difícil con cada ciclo. Los cabellos retroceden y se miniaturizan hasta que no son más que una pelusa no pigmentada, y este fenómeno conduce al agotamiento gradual de la cabellera.

Se ven afectadas preferentemente áreas, en particular los lóbulos temporal o frontal en hombres, y en mujeres se observa alopecia difusa de la corona de la cabeza.

40 El término alopecia también cubre una familia completa de daño al folículo capilar que da como resultado al final en una pérdida del cabello parcial o definitiva general. Esto es más particularmente alopecia androgénica. En un número considerable de casos, la pérdida prematura del cabello se produce en individuos genéticamente predispuestos, siendo entonces alopecia androcronogénica; esta forma de alopecia afecta en particular a los hombres.

45 Además, se sabe que ciertos factores, tales como un desequilibrio hormonal, un estrés fisiológico o malnutrición, pueden acentuar el fenómeno. Además, la pérdida o modificación del cabello puede estar relacionada con fenómenos estacionales.

50 Generalmente cualquier factor que influya en estos procesos, a saber, aceleración de la frecuencia del ciclo, miniaturización gradual del bulbo, adelgazamiento gradual de la matriz de colágeno perifolicular, engrosamiento de la vaina conjuntiva exterior, y una disminución en la vascularización, tendrá un efecto sobre el crecimiento del folículo capilar.

55 El folículo capilar está compuesto estructuralmente de dos compartimientos distintos: un compartimiento epitelial y un compartimiento dérmico (mesenquimatoso), y la interacción de estos dos compartimientos es esencial para la morfogénesis y recrecimiento del cabello, y también para mantener el ciclo folicular. El mantenimiento de la funcionalidad del compartimiento epitelial depende de la presencia y de la actividad de diversos depósitos de células madre. Un primer depósito de células madre epiteliales se identificó en una región denominada "protuberancia" en roedores (Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. (1990) Cell 61: 1329-1337). Desde este primer descubrimiento, se han identificado otros depósitos de células madre queratinocíticas, siempre en roedores. Estas células madre

desempeñan un papel esencial en la morfogénesis del folículo, pero también están implicadas en la reparación epidérmica en el caso de lesión. Los estudios sobre folículos humanos son mucho más raros, pero revelan al menos dos depósitos de células madre epiteliales caracterizadas por la expresión de queratina 19, que se alojan en la vaina de la raíz exterior (ORS) del folículo (terciario superior y terciario inferior) (Commo S, Gaillard O, Bernard BA. (2000) Differentiation 66:157-164).

Aunque se sabe que estos depósitos de células madre son absolutamente esenciales para mantener y regenerar el folículo capilar, actualmente hay muy poco conocimiento con respecto a la modificación de estas poblaciones celulares con la edad y/o con el comienzo y la progresión de alopecia (incluidos todos los tipos de alopecia). Recientemente se ha demostrado que la pérdida del cabello en los hombres con alopecia va acompañada de la desaparición no de las células madre sino más bien de ciertas poblaciones de células progenitoras (células proliferativas, más activas). Estos resultados sugieren que la alopecia podría estar relacionada con un problema de activación de células madre del folículo, o también de la expresión del potencial regenerativo completo de las células progenitoras (LA Garza et al. (2011) J Clin Invest. 121: 613-622).

La identificación de soluciones técnicas que permitan una mejor conservación de la funcionalidad/actividad de células madre epiteliales foliculares sería por lo tanto muy importante con vistas a conservar la calidad, densidad y forma del cabello a lo largo de la vida del individuo.

Dada la importancia del microentorno (nicho) en la regulación de la actividad y de la funcionalidad de células madre en tejidos diversos y variados, los inventores han llevado a cabo estudios a fin de identificar factores medioambientales que podrían regular la actividad de células madre epiteliales.

Para hacer esto, además de las investigaciones sobre células madre epiteliales foliculares, los inventores han ampliado al mismo tiempo su investigación a células epiteliales de la piel.

Sorprendente e inesperadamente, los inventores han descubierto así que ciertos depósitos de células madre epiteliales foliculares o de la piel nadan en un entorno hipóxico. Esta observación se reveló a través de anhidrasa carbónica IX, una proteína cuya expresión aumenta en condiciones hipóxicas (S Kaluz et al. (2010) Biochim Biophys Acta 1795:162-172).

Al demostrar, por medio de ensayos de detección inmunofluorescente dobles, que un subconjunto de anhidrasa carbónica IX expresa CD34, y tomando esto en combinación con la publicación de LA Garza et al. (2011) J Clin Invest. 121: 613-622 que muestra que células madre que poseen CD34 están mermadas en individuos con alopecia, los inventores han formulado por lo tanto la hipótesis de que la inducción de una señal de un estado hipóxico es capaz de mantener la funcionalidad de células madre epiteliales.

Un objeto de la presente invención es por lo tanto un procedimiento para evaluar in vitro al menos un agente activo capaz de conservar la funcionalidad de células madre epiteliales, en particular de mantener o estimular el crecimiento y/o la densidad y/o la renovación de un material queratínico, que consiste en determinar la capacidad del agente o agentes activos para imitar un estado hipóxico en el material queratínico, preferentemente en condiciones normóxicas, siendo el agente o agentes activos capaces de incrementar la expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia, en el material queratínico tratado con el agente o agentes activos en comparación con un material queratínico no tratado con el agente o agentes activos, preferentemente en condiciones normóxicas.

Preferentemente, este procedimiento consiste en determinar la capacidad del agente o agentes activos para imitar un estado hipóxico en el material queratínico, tras el tratamiento del material queratínico en un estado normóxico con el agente o agentes activos.

El término "imitar" pretende significar que el agente o agentes activos son capaces de incrementar la expresión de (es decir, expresar o sobreexpresar) un marcador biológico de hipoxia, en este caso al menos anhidrasa carbónica IX, que normalmente apenas se expresa o no se expresa en absoluto en el estado normóxico.

La expresión "estado normóxico" pretende significar un nivel de dioxígeno correspondiente al de la atmósfera terrestre ambiente, es decir, 21%.

La expresión "estado hipóxico" pretende significar un nivel de dioxígeno que es estrictamente menor que el de la atmósfera terrestre ambiente, por ejemplo menor que 5%, por ejemplo igual a 3%.

De este modo, el agente o agentes activos tienen la capacidad, a partir de un material queratínico en el estado normóxico, de llevar dicho material queratínico a un estado de tipo hipóxico, siendo así capaz de provocar efectos comparables a los de un microentorno hipóxico para las células madre epiteliales.

La expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de hipoxia se puede demostrar marcando anhidrasa carbónica IX en su forma proteica, preferiblemente mediante marcaje inmunofluorescente o transferencia Western de dicha proteína, y/o mediante análisis transcriptómico de anhidrasa carbónica IX.

Un objetivo dependiente o independiente del procedimiento como se define previamente puede consistir, como una variante o adicionalmente, en observar la expresión de un (o más) marcador(es) biológico(s) de hipoxia, tal como anhidrasa carbónica IX, en la capa basal de la región proximal de la vaina exterior de un folículo capilar.

Hasta donde saben los inventores, ningún documento de la técnica anterior enseña o sugiere el uso de tal procedimiento para evaluar agente o agentes activos con respecto a su capacidad para imitar hipoxia, en particular analizando la expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de esta hipoxia, en particular con vista a estudiar su propiedad para conservar la funcionalidad de células madre epiteliales, habiendo enseñado esencialmente los estudios previos por el momento que las condiciones hipóxicas tienen un impacto considerable sobre la biología de células madre embrionarias (U Silvan et al (2009) Differentiation 78:159-168) y también la biología de células madre derivadas de tejidos adultos, tales como células madre neuronales o células madre hematopoyéticas (P Eliasson et al Jonsson (2010) J Cell Physiol 222:17-22; DM Panchision (2009) J Cell Physiol 220:562-568).

A nivel celular, las condiciones hipóxicas tienen un impacto en particular sobre el control del ciclo celular, el metabolismo y la capacidad para responder al estrés oxidativo. La respuesta celular a condiciones hipóxicas se realiza bajo el control de HIFs (factores inducibles por hipoxia), y en particular HIF-1 que es un factor de transcripción compuesto de 2 subunidades, HIF1- α (alfa) y HIF1- β (beta), y que regulan la transcripción de más de 100 genes implicados en el ciclo celular, viabilidad, diferenciación, autofagia, etc. La activación de HIF-1 está regulada con precisión según el estado de oxigenación de las células. En condiciones de oxigenación elevada ("normoxia"), la subunidad HIF1-alfa es hidroxilada por prolil 4-hidroxilasa, que permite su ubiquitinación y su degradación por el proteosoma. Por el contrario, cuando disminuye la presión de dioxígeno (hipoxia), esta unidad ya no se degrada y entonces se puede acumular y migrar al núcleo para unirse a la subunidad HIF1-beta y formar de este modo el factor de transcripción HIF1.

Una solución preferente en el contexto de este procedimiento de evaluación puede consistir así en determinar si el agente o agentes activos a ensayar, correspondientes al procedimiento de evaluación según la invención, tienen la capacidad de actuar como inhibidores de prolil hidroxilasa con vistas a evitar su degradación de este factor de transcripción, y en particular la subunidad α (alfa) de la proteína HIF-1, y de este modo mantener un estado hipóxico de las células madre epiteliales. Por supuesto, esta ruta de acción no se debería de considerar limitante, siendo posible que el agente o agentes activos estén implicados en una o más rutas de acción adicionales o diferentes con vistas a producir este efecto hipóxico.

Un objeto de la presente invención es también el uso de un procedimiento de evaluación como se define previamente a fin de determinar un (o más) agente(s) activo(s) capaz (capaces) de mantener o incrementar la densidad del cabello y/o capaz (capaces) de combatir el envejecimiento de la piel.

Otras características, propiedades y ventajas de la presente invención surgirán más claramente al leer la descripción y los ejemplos que siguen.

35 Materiales queratínicos

El procedimiento de evaluación según la presente invención usa materiales queratínicos.

La expresión "materiales queratínicos" pretende significar fibras queratínicas y la piel. Las fibras queratínicas se refieren en particular al cabello, las cejas, las pestañas y el pelo corporal. Preferentemente, las fibras queratínicas se refieren al cabello.

40 Tal material queratínico se ensaya in vitro en el sentido de que se ensaya aislado del organismo al que pertenece.

Para esto, puede derivar, por ejemplo, de desecho quirúrgico, de una biopsia, de un cultivo de queratinocitos foliculares o de la piel, o de un cultivo de células madre epiteliales, por ejemplo un cultivo de células madre epiteliales foliculares o de la piel.

Agentes activos

45 El procedimiento de evaluación según la presente invención usa al menos un agente activo para ponerlo en presencia del material queratínico aislado como se define previamente.

Preferiblemente, el agente o agentes activos a ensayar en el material queratínico son capaces de imitar hipoxia en un material queratínico ensayado en condiciones normóxicas.

50 Un agente activo según la presente invención se ensaya con respecto a su capacidad para incrementar la expresión de (es decir, para expresar o sobreexpresar) al menos anhidrasa carbónica 9, como marcador biológico de hipoxia, en dicho material queratínico aislado.

Tal agente activo también se puede ensayar con respecto a su capacidad para expresar o sobreexpresar uno o más marcadores biológicos diferentes de la hipoxia.

Por ejemplo, según una realización particular, este agente activo se puede ensayar con respecto a su capacidad para incrementar la expresión de (es decir, expresar o sobreexpresar) el transportador 1 de glucosa (GLUT-1), como marcador o marcadores biológicos de hipoxia.

5 Según una realización particular, este agente activo actúa indirectamente sobre la proteína HIF-1. En particular, este agente activo actúa sobre una enzima de degradación de HIF-1. Más específicamente, este agente activo actúa preferentemente como un inhibidor de prolil hidroxilasa.

Preferentemente, el agente o agentes activos son capaces de actuar, independientemente del nivel de oxigenación celular, sobre la estabilización del nivel de expresión de la proteína HIF-1.

10 También preferiblemente, este agente activo no da como resultado una variación transcriptómica de HIF-1, en particular no da como resultado una variación de la expresión del gen HIF-1.

En consecuencia, dicho agente activo actúa preferentemente, solo, e indirectamente, sobre la proteína HIF-1.

Procedimiento de evaluación

15 El procedimiento de evaluación según la invención pretende estudiar los efectos de uno o más agentes activos sobre la conservación de las funcionalidades de células madre epiteliales al observar su capacidad para imitar un estado hipóxico en un material queratínico aislado, observando la expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia, en comparación con un material queratínico de control no tratado.

20 Un primer procedimiento de evaluación puede consistir en llevar a cabo un marcaje, preferiblemente inmunomarcaje, por ejemplo mediante inmunofluorescencia o transferencia Western, de al menos la proteína anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia. Más particularmente, se pueden usar análisis de materiales queratínicos, tales como de tejidos derivados del cuero cabelludo humano, en particular folículos capilares, o de cultivos de queratinocitos foliculares o de la piel, con anticuerpos específicos para anhidrasa carbónica IX, un marcador biológico de la hipoxia, puede usarse a fin de observar variaciones en la expresión, respectivamente en condiciones hipóxicas y en condiciones normóxicas en presencia o ausencia de agente o agentes activos a fin de estudiar si el agente o agentes activos son capaces de imitar un estado hipóxico.

25 Un segundo procedimiento de evaluación puede consistir en llevar a cabo un análisis transcriptómico de anhidrasa carbónica IX, cuya expresión del gen correspondiente se modifica mediante una señal hipóxica, usando la técnica de RT-qPCR, sobre materiales queratínicos, por ejemplo sobre cultivos in vitro de queratinocitos o bulbos capilares aislados mediante microdissección y colocados en cultivo ex vivo, en condiciones hipóxicas y en condiciones normóxicas en presencia o ausencia de dicho agente o agentes activos a ensayar, a fin de estudiar si el agente o agentes activos son capaces de imitar un estado hipóxico.

30 Es posible añadir opcionalmente a estos dos procedimientos de evaluación un procedimiento dirigido a establecer el impacto del agente o agentes activos capaces de imitar la hipoxia sobre la calidad de las células madre epiteliales. Para esto, se puede llevar a cabo un ensayo de CFE (eficiencia formadora de colonias) para queratinocitos (incluyendo células madre epiteliales) que consiste en observar, respectivamente, en condiciones hipóxicas y en condiciones normóxicas en presencia o ausencia de agente o agentes activos, el impacto de la presencia del agente o agentes activos sobre la frecuencia de las células capaces de generar un clon celular en una población dada, y también sobre la morfología clonal obtenida, para establecer de este modo su participación en la conservación de la funcionalidad de las células madre epiteliales tratadas con el agente o agentes activos.

35 Según una realización ilustrativa y no limitante, se puede implementar al menos uno de estos procedimientos de evaluación o todos estos procedimientos de evaluación a fin de establecer el efecto de uno o más agentes activos sobre la expresión de al menos anhidrasa carbónica como marcador biológico de la hipoxia.

Clave para las figuras

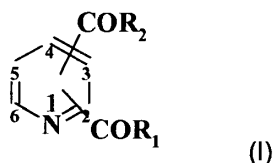
Figura 1: Análisis del nivel de expresión/estabilización de la proteína HIF1-alfa mediante transferencia Western.

EJEMPLOS

45 A continuación se dan a título de ilustración de la presente invención varios ejemplos de procedimientos de evaluación según la invención. Tales ejemplos no limitan el alcance de la invención, siendo capaces aquellos expertos en la técnica de usar otros procedimientos conocidos per se a fin de demostrar la estimulación de anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia sobre materiales queratínicos.

I – Protocolo y resultados

50 A título de ilustración de agentes activos correspondientes al procedimiento de evaluación según la invención, se puede hacer mención de ácidos piridindicarboxílicos y ciertos derivados, en particular ésteres y amidas. A título de ejemplo, se usó un compuesto que se sabe que es adecuado para inhibir prolil hidroxilasa, en este caso un compuesto escogido de derivados de ácido piridindicarboxílico de fórmula general (I) o una de sus sales:



fórmula (I) en la cual:

- R₁ y R₂ representan, independientemente entre sí, OH, OR', -NH₂, -NHR' o -NR'R", representando R' y R", independientemente entre sí, un radical alquilo de C₁-C₁₈ saturado o insaturado, lineal o ramificado, o cualquier radical arilo, estando este radical arilo o alquilo opcionalmente sustituido con al menos un grupo OH, alcoxi, aciloxi, amino o alquilamino, o R' y R" representan juntos un heterociclo, como se menciona en la solicitud EP1352629, y en particular se usó piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo.

1/ Primer ejemplo de procedimiento de evaluación

Este primer procedimiento consiste en observar, con un microscopio de fluorescencia óptico, un folículo capilar tras el marcaje inmunofluorescente usando anticuerpos específicos para anhidrasa carbónica IX, un marcador biológico de la hipoxia, en ausencia y presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo.

En virtud de este procedimiento, es posible observar la expresión de la proteína anhidrasa carbónica IX, que está más localizada en la capa basal de la región proximal de la vaina exterior del folículo capilar que contiene las células madre epiteliales foliculares.

2/ Segundo ejemplo de procedimiento de evaluación

Este segundo procedimiento consiste en llevar a cabo un análisis transcriptómico del gen que codifica anhidrasa carbónica IX, cuya expresión se modifica mediante una señal hipóxica, usando la técnica de RT-qPCR, sobre bulbos capilares aislados mediante microdissección a nivel de la hipodermis del cuero cabelludo humano y colocados en cultivo ex vivo durante 4 horas en condiciones hipóxicas (3% de dioxígeno) o en 21% de dioxígeno, en ausencia (control) o en presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo.

Después de 4 horas de incubación de los bulbos completos en condiciones hipóxicas o en condiciones normóxicas en presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo, se observa expresión estándar de anhidrasa carbónica 9, indicando que el tratamiento con piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo induce un perfil molecular similar al inducido por hipoxia.

3/ Tercer ejemplo de procedimiento de evaluación

Este tercer ejemplo consiste en llevar a cabo un análisis del nivel de expresión/estabilización de la proteína HIF1-alfa usando como base la técnica de transferencia Western. En resumen, en condiciones normóxicas, la proteína HIF1-alfa es hidroxilada en un resto de prolina (reacción catalizada por una prolil hidroxilasa), es ubiquitinilada y entonces es degradada por el proteosoma. En condiciones hipóxicas, la proteína HIF1-alfa no es hidroxilada, y su nivel de expresión se mantiene. Para caracterizar el efecto de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo sobre el nivel de expresión/estabilización de HIF1-alfa, se preparó un extracto proteico en cultivos de queratinocitos derivados de la vaina exterior de folículos capilares humanos mantenidos y colocados en cultivo en condiciones hipóxicas o en condiciones normóxicas, en ausencia o presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo. La inmunodetección de la proteína HIF1-alfa revela que el nivel de expresión de esta proteína aumenta cuando las células se hacen crecer en cultivo en condiciones hipóxicas (3% de oxígeno) en comparación con condiciones normóxicas (21% de oxígeno). Igualmente, el cultivo en condiciones normóxicas en presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo induce un incremento en la cantidad de proteína detectada. A este respecto, se puede afirmar que el efecto de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo en condiciones normóxicas imita el efecto de condiciones hipóxicas sobre la expresión/estabilización de la proteína HIF1-alfa.

II – Evaluación de la conservación de la funcionalidad de células madre epiteliales

Esta evaluación de la calidad de células madre epiteliales tratadas o no tratadas con el agente o agentes activos se puede establecer, por ejemplo, por medio de un ensayo de CFE (eficiencia formadora de colonias) para queratinocitos (incluyendo células madre epiteliales), que consiste en observar, respectivamente, en condiciones hipóxicas y en ausencia o presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo, el impacto de este agente activo sobre la frecuencia de células capaces de generar un clon celular en una población dada, y también sobre la morfología clonal obtenida.

Para hacer esto, se cortaron folículos capilares completos aislados del cuero cabelludo mediante cirugía cosmética en trozos de 1 cm², y entonces se trataron con 2,4 U/ml diluido en un medio de William E y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras se enjuagaron con PBS, se retiró la epidermis usando pinzas pequeñas,

y cada folículo capilar se extrajo y se colocó en PBS, en hielo. Después de eliminar el PBS, los folículos se colocan en 0,5 ml de 1X tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C a fin de disociar solamente los queratinocitos de la región inferior de la vaina exterior del folículo capilar. El proceso enzimático se detiene añadiendo 1 ml de medio que contiene 10% de suero, y el sobrenadante que contiene las células disociadas se filtra entonces usando un tamiz celular (70 µm). Las células recuperadas se centrifugan entonces a 1000 revoluciones/minuto durante 15 minutos a 4°C, y el precipitado celular se resuspende en medio DMEM (Cambrex) - Hams F12 (mezcla 3:1) que contiene 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico, suplementado con suero fetal de ternera 10 (HyClone), aminoácidos no esenciales, 5 µg/ml de insulina, 0,18 mM de adenina, 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 2 nM de triyodotironina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1 µM de isoprotenerol, 5 µg/ml de transferrina, 4 mM de glutamina y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina.

A continuación, las células de la vaina epitelial exterior así extraídas de los folículos capilares y disecadas se siembran subsiguientemente en una proporción de 1000 células/placa de cultivo en condiciones de CFE, sobre una capa de fibroblastos 3T3 irradiados. Las células se cultivan entonces a 3% de dioxígeno (condiciones hipóxicas) o a 21% de dioxígeno en presencia de piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo (en concentraciones que oscilan de 50 a 500 µM). Un control que no está tratado y que se cultiva a 21% de dioxígeno sirve como referencia. El medio se cambia al 3° día y al 8° día, y el cultivo se detiene en el 10° día. Al final del cultivo clonogénico y tras fijar (vía etanol al 70%) y teñir (incubación con eosina, aclarado e incubación después con BlueRAL 555) de los clones celulares obtenidos, se analiza la morfología de los clones y de las células que forman estos clones.

El cultivo de estas células en condiciones hipóxicas (3% de dioxígeno) tiene muy claramente un efecto sobre la morfología clonal. Los clones obtenidos muestran una morfología más compacta y menos difusa (los bordes de los clones están bien delimitados) que aquellos obtenidos en condiciones de cultivo convencionales a 21% de dioxígeno. Los clones están compuestos de células pequeñas, muy conectadas y más homogéneas, que son reminiscencias de los holoclones descritos por Y. Barrandon y H. Green (Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, 84:2302-2306). Estos resultados se observaron de una manera muy reproducible, y sugieren un mejor mantenimiento de la inmadurez de las células en cultivo.

Los clones obtenidos tras el tratamiento con piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo también son menos difusos y menos densos que los controles incubados en presencia de 21% de dioxígeno. En general, los clones obtenidos están compuestos de células de calidad muy buena. El número de clones no disminuye significativamente en comparación con las condiciones de control de 21% de dioxígeno.

En resumen, el tratamiento con piridin-2,4-dicarboxilato de dietilo en condiciones normóxicas genera clones similares a los obtenidos en condiciones hipóxicas.

III – Interpretación

Los inventores fueron capaces de observar colocalización de las células madre epiteliales y de anhidrasa carbónica IX, nadando las células madre en un entorno hipóxico. En particular, la expresión del marcador biológico de la hipoxia se puede observar en la capa basal de la región proximal de la vaina exterior de un folículo capilar, también denominada depósito inferior de la vaina exterior del folículo capilar.

Los inventores mostraron, sorprendente e inesperadamente, que un agente activo, y más específicamente un inhibidor de prolil hidroxilasa, que actúa, independientemente del nivel de oxigenación celular, sobre la estabilización del nivel de expresión de la proteína HIF1-alfa, imita parcialmente un efecto hipóxico. De hecho, el tratamiento en condiciones normóxicas de los folículos capilares, en condiciones de supervivencia, con tal agente activo inhibidor de prolil hidroxilasa induce un perfil transcriptómico similar al inducido por las condiciones hipóxicas. Además, la clonogenicidad de las poblaciones celulares recientemente aisladas de la vaina exterior de folículos capilares humanos se ve impactada de forma similar ya sea mediante tratamiento con tales inhibidores de prolil hidroxilasa o mediante cultivo en condiciones hipóxicas. Estos estudios demuestran así que estos agentes activos tienen la capacidad para reproducir los efectos de una de las características fisiológicas (a saber, hipoxia) del nicho del depósito inferior de células madre foliculares.

Por supuesto, el agente o agentes activos evaluados por medio del procedimiento o procedimientos de evaluación según la presente invención pueden actuar vía una o más rutas biológicas adicionales o diferentes para imitar el efecto hipóxico observado.

Obviamente, los expertos en la técnica tendrán cuidado de introducir modificaciones o adiciones opcionales de manera que las propiedades ventajosas del procedimiento de evaluación según la invención no se vean afectadas de forma adversa, o no se vean afectadas sustancialmente, por la adición concebida.

A lo largo de la solicitud, la expresión “que comprende un”, o “que incluye un” significa “que comprende al menos un” o “que incluye al menos un”, excepto que se especifique de otro modo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para evaluar al menos un agente activo capaz de conservar la funcionalidad de células madre epiteliales, en particular de mantener o estimular el crecimiento y/o la densidad y/o la renovación de un material queratínico, que consiste en determinar la capacidad del agente o agentes activos para imitar un estado hipóxico en el material queratínico, siendo el agente o agentes activos capaces de incrementar la expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia, en el material queratínico tratado con el agente o agentes activos en comparación con el material queratínico no tratado con el agente o agentes activos.
2. El procedimiento de evaluación según la reivindicación 1, que consiste en determinar la capacidad del agente o agentes activos para imitar un estado hipóxico en el material queratínico, tras el tratamiento del material queratínico en un estado normóxico con el agente o agentes activos.
3. El procedimiento de evaluación según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente o agentes activos son capaces de actuar, independientemente del nivel de oxigenación celular, sobre la estabilización del nivel de expresión de la proteína HIF-1.
4. El procedimiento de evaluación según la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el agente o agentes activos son capaces de actuar indirectamente sobre la proteína HIF-1, y en particular de inhibir prolil hidroxilasa a fin de evitar la degradación de la subunidad α (alfa) de la proteína HIF-1.
5. El procedimiento de evaluación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente o agentes activos son incapaces de generar una variación transcriptómica de HIF-1.
6. El procedimiento de evaluación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, además de la expresión de anhidrasa carbónica IX, el agente o agentes activos son capaces de incrementar la expresión del transportador 1 de glucosa (GLUT-1) como marcador biológico de la hipoxia, en el material queratínico tratado con el agente o agentes activos en comparación con el material queratínico no tratado con el agente o agentes activos.
7. El procedimiento de evaluación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de al menos anhidrasa carbónica IX como marcador biológico de la hipoxia se demuestra marcando anhidrasa carbónica IX en su forma proteica, preferiblemente mediante marcaje inmunofluorescente o transferencia Western de dicha proteína, y/o mediante análisis transcriptómico de anhidrasa carbónica IX.
8. El procedimiento de evaluación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consiste en observar la expresión del marcador o marcadores biológicos de la hipoxia en la capa basal de la región proximal de la vaina exterior de un folículo capilar.
9. El uso de un procedimiento de evaluación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores a fin de determinar si uno (o más) agente(s) activo(s) es (son) capaz (capaces) de mantener o incrementar la densidad capilar y/o capaz (capaces) de combatir el envejecimiento de la piel.

FIGURA 1

